



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Identificación fenotípica y molecular de bacterias  
productoras de biofilm presentes en la formación del  
biofouling en cultivos de “Concha de Abanico”  
(*Argopecten purpuratus*), en la bahía de Huaynuma,  
Casma - Perú**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga  
Parasitóloga

**AUTOR**

Evelin Eliza GONZALES BERNABEL

**ASESOR**

Dra. Susana GUTIÉRREZ MORENO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Gonzales, E. (2019). *Identificación fenotípica y molecular de bacterias productoras de biofilm presentes en la formación del biofouling en cultivos de “Concha de Abanico” (Argopecten purpuratus), en la bahía de Huaynuma, Casma - Perú*. Tesis para optar el título profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## **HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS**

**CODIGO ORCID DEL AUTOR:** No tengo

**CODIGO ORCID DEL ASESOR:** 0000-0002-7885-7384

**DNI del Autor:** 47402037

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN:** No pertenece

**INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN:**

**Convenio N°302 INNOVATE PERÚ – PIAP-2015**

**UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN. DEBE INCLUIR LOCALIDADES Y COORDENADAS GEOGRÁFICAS**

En las instalaciones del campo acuícola ACUALTURA Y PESCA S.A.C, Bahía de Huaynuma, ciudad de Casma, región Áncash, Perú (Km. 383.3 de la Carretera Panamericana Norte, COORDENADAS GEOGRAFICAS:COORDENADAS UTM (9°20'49.3"S – 78°25'41.1"W).

**AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ:**  
Marzo 2017- Marzo 2018



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 14:05 horas del 16 de diciembre de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **EVELIN ELIZA GONZALES BERNABEL**.

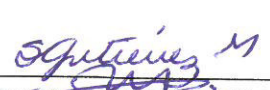
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 030-EPMP-2019, la titulando expuso su tesis: **“IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE BIOFILM PRESENTES EN LA FORMACIÓN DEL BIOFOULING EN CULTIVOS DE “CONCHA DE ABANICO” (*Argopecten purpuratus*), EN LA BAHÍA DE HUAYNUMA, CASMA - PERÚ**”, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 12..., calificativo: Aprobado con mención honrosa

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** a **EVELIN ELIZA GONZALES BERNABEL** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 15:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 16 de diciembre de 2019.

  
Dr. ENRIQUE MAMANI ZAPANA  
(PRESIDENTE)

  
Dra. SUSANA GUTIERREZ MORENO  
(ASESORA)

  
Mg. JORGE LEON QUISPE  
(MIEMBRO)

  
Mg. MIGUEL TALLEDO RIVERA  
(MIEMBRO)

## DEDICATORIA

*Esta investigación se lo dedico a mi madre Teófila Bernabel Mejía, quien con su amor y esfuerzo hizo posible que termine esta etapa de mi vida, porque siempre fue mi apoyo, mi fuerza y mi más grande motivación en todo momento.*

*A mis hermanos; César, Lizeth, Jhon, Elvis y Sayuri quienes de alguna manera me apoyaron en cumplir con esta etapa de mi vida.*

*A mi abuelo Florencio Bernabel quién a pesar no estar más a mi lado, su cariño prevalecerá para siempre en mi corazón y a mi abuela Angélica Mejía Salcedo, por brindarme siempre su amor incondicional y por llevarme siempre en sus oraciones.*

*A Dios por permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.*

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación no hubiera sido posible sin el esfuerzo de muchas personas, por ello quiero agradecerles por todo el apoyo principalmente a mi madre y hermanos.

A mi asesora; Dra. Susana Gutiérrez Moreno y a mis revisores por haberme apoyado en esta etapa tan importante de mi formación profesional.

A todos los miembros del proyecto “Obtención de componentes bioactivos de pepino de mar *Patallus mollys* sobre bacterias formadoras de *biofouling*” Convenio N°302 INNOVATE PERÚ – PIAP-2015, sobre todo a Pablo Londoño y Claudia Sánchez, por haber confiado en mí para realizar esta parte del proyecto.

Al Instituto Tecnológico De La Producción (ITP) y a la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional De San Marcos (UNMSM), por el uso de las instalaciones.

A mi mejor amiga, Eleonora Córdova, por haberme apoyado todo este tiempo en superar momentos muy difíciles de este proceso.

A todos ellos y a los que no están aquí ¡gracias por haberme facilitado el desarrollo de esta investigación y por haber confiado siempre en mí!

## ABREVIATURAS

**BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*

**CV:** Cristal de violeta

**DBO<sub>5</sub>:** Demanda Bioquímica de Oxígeno

**TCBS:** Agar Tiosulfato citrato con sales biliares

**SWT:** Sea Water Tryptone (Agar agua de mar triptona)

**LB:** Medio Luria Bertani

**TSB:** Medio Trypticase de soya

**ITP:** Instituto Tecnológico de la Producción

**TSI:** Agar Triple Azúcar Hierro

**LIA:** Agar Hierro Lisina

**mg/L:** Miligramo por litro

**μm:** Micrómetro

**NMP:** Numero Más Probable

**VP: Medio** Voges – Proskauer

**RM: Medio** Rojo de metilo

**OF (glucosa):** Medio Basal de Óxido-Fermentación

**OF (sacarosa):** Medio Basal de Óxido-Fermentación

**OF (lactosa):** Medio Basal de Óxido-Fermentación

**pH:** Potencial de iones hidronio

**SIM:** Medio Sulfuro, Indol y motilidad

**Ups:** Unidades prácticas de salinidad



# ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Cultivo de concha de abanico suspendido en el fondo marino (cultivo <i>Long-line</i> ). Compuesto por tres sistemas: 1. <i>Sistema de flotación</i> (formado por boyas y flotadores); 2. <i>Sistema de anclaje</i> (formado principalmente por material de concreto) y 3. <i>Sistema de crecimiento</i> (formado principalmente por <i>Pearl Nets</i> y linternas de cultivo). Fuente: PRODUCE, 2004. ....	6
<b>Figura 2.</b> Secuencia de etapas del desarrollo del <i>biofouling</i> . Fuente: Wahl, 1989. ....	11
<b>Figura 3.</b> Proceso de colonización bacteriana sobre una superficie. Fuente: Wahl, 1989. ....	13
<b>Figura 4.</b> Etapas del desarrollo de un <i>biofilm</i> bacteriano. 1, Adhesión a una superficie. 2, División celular y formación de colonias. 3, Secreción de sustancias poliméricas extracelulares. 4, Formación de canales y 5, Maduración y salida de células para colonizar otras superficies. Fuente: Marquina y Santos, 2010. ....	17
<b>Figura 5.</b> Ubicación geográfica de las coordenadas de los puntos de muestreo en la Bahía de Huaynuma o Guaynuma – Casma, Perú. ....	26
<b>Figura 6.</b> Hisopado de la muestra (malla L1) y enjuague con agua de mar estéril ....	28
<b>Figura 7.</b> Dilución de la muestra (caldo de cultivo) en solución salina. ....	28
<b>Figura 8.</b> Distribución de las muestras y controles en cada placa. C1, C2, C3 y C4 (cepas bacterianas), C+ (control positivo) y C- (control negativo). ....	29
<b>Figura 9.</b> Bacterias marinas aisladas en las dos temporadas de muestreo (verano y primavera) representadas en porcentajes ....	38
<b>Figura 10.</b> Producción de <i>biofilm</i> (por bacterias utilizadas como control positivo) ( <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. aeruginosa</i> PAO1), contrastado con los controles negativos (caldo TSB para cepas de <i>Pseudomonas</i> y caldo SWT para cepas de <i>Vibrio</i> ). ....	40

<b>Figura 11.</b> Coloración del <i>biofilm</i> (producido por bacterias utilizadas como control positivo) coloreadas con cristal de violeta al 1%. (Stepanovic <i>et al.</i> , 2007). ....	41
<b>Figura 12.</b> Resuspensión del <i>biofilm</i> (producidas por bacterias utilizadas como control positivo) en ácido acético al 30 %. (Stepanovic <i>et al.</i> , 2007). ....	42
<b>Figura 13.</b> Valores de adherencia de las bacterias productoras de <i>biofilm</i> . Se muestran las barras de desviación estándar para cada valor de adherencia. ....	44
<b>Figura 14.</b> Valores de adherencia de las bacterias marinas clasificadas como fuertemente productoras de <i>biofilm</i> . Se muestran las barras de desviación estándar para cada valor de adherencia. ....	45
<b>Figura 15.</b> Valores de adherencia de las bacterias marinas clasificadas como moderadamente productoras de <i>biofilm</i> . Se muestran las barras de desviación estándar para cada valor de adherencia. ....	46
<b>Figura 16.</b> Valores de adherencia de las bacterias marinas clasificadas como débilmente productoras de <i>biofilm</i> . Se muestran las barras de desviación estándar para cada valor de adherencia. ....	47
<b>Figura 17.</b> Valores de adherencia de las bacterias marinas clasificaron como no productoras de <i>biofilm</i> . Se muestran las barras de desviación estándar para cada valor de adherencia. ....	48
<b>Figura 18.</b> Clasificación de las bacterias según su adherencia y producción de <i>biofilm</i> : fuertemente productoras de <i>biofilm</i> (FP), moderadamente productoras de <i>biofilm</i> (MP), débilmente productoras de <i>biofilm</i> (DP) y no productoras de <i>biofilm</i> (NP). ....	49
<b>Figura 19.</b> Crecimiento general de la cepa M28 en agar SWT (24 h).....	50
<b>Figura 20.</b> Crecimiento y caracterización cultural de las colonias de la cepa M28, en agar SWT.....	51
<b>Figura 21.</b> Crecimiento general de la cepa M28 en agar TCBS (24 h). ....	53
<b>Figura 22.</b> Crecimiento y caracterización cultural de las colonias de la cepa M28, en agar TCBS. ....	53

<b>Figura 23.</b> Crecimiento de la cepa M8 en caldo peptona (por duplicado) con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl).....	57
<b>Figura 24.</b> Electroforesis de ADN extraído de bacterias marinas fuertemente productoras de <i>biofilm</i> . Bandas intensas muestran la presencia de ADN de dichas bacterias. Ladder de 1 Kb. Gel de agarosa al 1.5 %.....	60
<b>Figura 25.</b> Árbol filogenético construido con el método <i>Neighbor-Joining</i> basado en las distancias genéticas de las secuencias de la región ADNr 16S de los cultivos puros de las bacterias fuertemente productoras de <i>biofilm</i> (M1, M8, M15, M17, M24, M25, M28, M30, M32, CG5, CS39, CS5, MX51, MP7, MT7 y MT8), con 1000 repeticiones. El árbol se construyó usando la secuencia de <i>Staphylococcus aureus</i> como grupo externo. ....	62

# ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Valores máximos y mínimos de los parámetros fisicoquímicos implicados en los cultivos de concha de abanico. ....	5
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de cepas bacterianas en cuatro grupos según el nivel producción de <i>biofilm</i> . ....	31
<b>Tabla 3.</b> Valores indicativos de concentración y pureza de las muestras de ADN para determinar la calidad del ADN en solución. Fuente: Banco Nacional de ADN Carlos III de la Universidad de Salamanca, España .....	34
<b>Tabla 4.</b> Tinción Gram para bacterias marinas aisladas de la muestra (caldo y malla) en agar SWT de las dos temporadas (verano y primavera).....	37
<b>Tabla 5.</b> Valores de adherencia obtenidos a partir de la lectura del espectrofotómetro (absorbancia 570 nm) provenientes de las bacterias productoras de <i>biofilm</i> (controles). ....	39
<b>Tabla 6.</b> Valores de adherencia obtenidos a partir de la lectura del espectrofotómetro (absorbancia 570 nm) provenientes de las bacterias aisladas del cultivo de “concha de abanico” .....	43
<b>Tabla 7.</b> Características culturales de las cepas fuertemente productoras de <i>biofilm</i> en agar SWT.....	52
<b>Tabla 8.</b> Características culturales de cepas fuertemente productoras de <i>biofilm</i> en agar TCBS. ....	54
<b>Tabla 9.</b> Resultado de las pruebas bioquímicas de bacterias fuertemente productoras de <i>biofilm</i> .....	56
<b>Tabla 10.</b> Bacterias fuertemente productoras de <i>biofilm</i> en diferentes concentraciones de NaCl.....	58

<b>Tabla 11.</b> Cuantificación de ADN extraído de las bacterias marinas fuertemente productoras de <i>biofilm</i> .....	59
<b>Tabla 12.</b> Resultados de la identificación molecular de las cepas fuertemente productoras de <i>biofilm</i> .....	61

# ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.....	V
Índice de tablas.....	viii
Resumen.....	XIV
Abstract.....	V
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 El ambiente marino y los microorganismos .....	4
2.2 Bahía de Huaynuma - Casma .....	4
2.3 Concha de abanico “ <i>Argopecten purpuratus</i> ” .....	5
2.3.1 Microorganismos asociados a moluscos bivalvos .....	7
2.4 Bacterias marinas .....	7
2.5 Género <i>Vibrio</i> .....	8
2.6 El <i>biofouling</i> .....	10
2.6.1 Etapas de desarrollo del <i>biofouling</i> .....	11
2.6.1.1 Acondicionamiento bioquímico.....	11
2.6.1.2 Colonización bacteriana.....	12
2.6.1.3 Colonización de eucariontes unicelulares.....	14
2.6.1.4 Colonización de eucariontes multicelulares.....	14
2.7 El <i>biofilm</i> .....	15
2.7.1 Etapas del desarrollo del <i>biofilm</i> .....	16
2.7.1.1 Adhesión a una superficie.....	16
2.7.1.2 División y formación de colonias.....	18
2.7.1.3 Secreción de sustancias poliméricas extracelulares.....	18

2.7.1.4	Formación de canales.....	19
2.7.1.5	Maduración y salida de células para la formación de un nuevo <i>biofilm</i> .....	19
2.8	Efectos del <i>biofilm</i> y <i>biofouling</i> en la industria .....	20
2.9	ADN ribosomal 16S.....	20
III.	HIPÓTESIS.....	22
IV.	OBJETIVOS.....	23
4.1	Objetivo general.....	23
4.2	Objetivos específicos .....	23
V.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
5.1	Materiales .....	24
5.1.1	Material biológico .....	24
5.1.1.1	Bacterias marinas aisladas.....	24
5.1.1.2	Cepas bacterianas de referencia.....	24
5.2	Metodología .....	25
5.2.1	Aislamiento de bacterias marinas proveniente de zonas de cultivo de concha de abanico ( <i>Argopecten purpuratus</i> ).....	25
5.2.1.1	Lugar de colección de muestras y ejecución del estudio.....	25
5.2.1.2	Toma de muestra.....	25
5.2.1.3	Aislamiento de bacterias marinas.....	25
5.2.2	Evaluación de la adherencia y producción de <i>biofilm</i> .....	29
5.2.3	Identificación fenotípica de bacterias fuertemente productoras de <i>biofilm</i> .....	31
5.2.3.1	Caracterización cultural.....	31
5.2.3.2	Pruebas bioquímicas.....	32

5.2.3.3	Prueba de Tolerancia a la sal (Cloruro de sodio, NaCl).....	32
5.2.4	Identificación molecular de bacterias fuertemente productoras de <i>biofilm</i> .....	33
5.2.4.1	Preparación de la muestra y extracción del ADN.....	33
5.2.4.2	Determinación de la concentración del ADN total.....	33
5.2.4.3	Amplificación del ADN.....	34
5.2.4.4	Electroforesis.....	35
5.2.4.5	Purificación de productos del PCR.....	35
5.2.4.6	Secuenciamiento del marcador ADNr 16S.....	35
5.2.4.7	Identificación molecular.....	35
5.2.4.8	Análisis filogenético.....	36
5.2.5	Análisis estadístico.....	36
VI.	RESULTADOS.....	37
6.2	Adherencia y producción de <i>biofilm</i> .....	38
6.2.1	Bacterias productoras de <i>biofilm</i> .....	38
6.3	Identificación fenotípica.....	50
6.3.1	Características culturales.....	50
6.3.2	Pruebas bioquímicas.....	55
6.3.3	Prueba de tolerancia a la sal (Cloruro de Sodio NaCl) .....	57
6.4	Identificación molecular.....	59
6.4.1	Cuantificación de ADN.....	59
6.4.2	Electroforesis .....	60
6.4.3	Identificación molecular.....	60
6.4.4	Análisis filogenético.....	61
VII.	DISCUSIÓN.....	63



7.1	Aislamiento de bacterias productoras de <i>biofilm</i> adheridas en mallas del cultivo de “concha de abanico” ( <i>Argopecten purpuratus</i> ).....	63
7.2	Evaluación de bacterias marinas según su producción de <i>biofilm</i> , mediante prueba de adherencia.....	64
7.3	Identificación fenotípica de bacterias fuertemente productoras de <i>biofilm</i> .....	66
7.4	Identificación molecular de bacterias fuertemente productoras de <i>biofilm</i> , utilizando las secuencias del ADNr 16S.....	69
7.5	Comparación entre la cantidad y diversidad de bacterias fuertemente productoras de <i>biofilm</i> en la temporada verano y temporada primavera .....	73
VIII.	CONCLUSIONES .....	76
IX.	RECOMENDACIONES .....	77
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78
XI.	ANEXOS .....	95
11.1	Protocolos de preparación de medios y reactivos .....	95
11.1.1	Por componentes.....	95
11.1.2	Siguiendo las instrucciones del fabricante.....	97
11.2	Características culturales de bacterias fuertemente productoras de <i>biofilm</i> aisladas del cultivo de “concha de abanico” ( <i>A. purpuratus</i> ), en la bahía de Huaynuma – Casma, Perú.....	98
11.3	Imágenes de Tinción Gram y pruebas bioquímicas .....	114

## RESUMEN

El *biofouling* es una acumulación indeseada de sustancias orgánicas en una superficie sumergida en agua y se considera que el origen se debe principalmente a la formación de *biofilm* por parte de bacterias, el cual sirve de alimento en la colonización de organismos superiores responsables de impactos negativos en el ambiente e industria acuática. Debido a esto, se debe identificar bacterias asociadas a este fenómeno en cultivos de “concha de abanico” (*Argopecten purpuratus*) en la bahía de Huaynuma, Casma – Perú, que permita realizar trabajos para disminuir la adhesión bacteriana.

Se aislaron 40 cepas en total, las cuales fueron sometidas a la prueba de adherencia, para evaluar la producción de *biofilm* y su capacidad para adherirse a un sustrato, determinándose así que 16 (40%), 8 (20%) y 7 (17.5%) cepas fueron: fuerte, moderada y débilmente productoras de *biofilm* y 9 (22.5%) cepas no productoras.

Posteriormente se realizó la identificación: fenotípica; basados en las pruebas del Manual de Bergey, cuyos resultados de similitud fueron superiores al 90%, predominando el género *Vibrio*, principalmente la especie de *V. alginolyticus*, la identificación molecular ratificó el predominio del género *Vibrio*, en especial *V. alginolyticus*, sin embargo esta identificación no fue específica para una sola especie por los altos porcentajes de similitud (100%) entre dos o más cepas. Por su parte la cepa M28 fue identificada al 100% como *Photobacterium damsela* subs. *damsela*., el cual se reporta por primera vez en cultivos de “concha de abanico” en la Bahía de Huaynuma.

El género *Vibrio*, principalmente *V. alginolyticus* es la principal bacteria cultivable responsable del asentamiento primario para la formación de *biofouling* en el cultivo de “concha de abanico”.

**Palabras clave:** *Biofilm*, bacterias marinas, ADNr 16S, concha de abanico (*Argopecten purpuratus*), *Vibrio alginolyticus*.

## ABSTRACT

Biofouling is the unwanted accumulation of organic compounds in a surface that is submerged in water, and is considered to be mainly originated by the biofilm of bacteria, which is a source of food for higher organisms that colonize and have a negative impact on the environment and the aquatic industry. Because of this, the identification of which bacteria are associated to this phenomenon in the Peruvian scallop cultures from Huaynuma Bay, Casma – Peru must be made, as this will allow conducting research projects on how to decrease the microbial adhesion.

A total of forty strains of marine bacteria were isolated in two seasons and tested for adherence capability, to assess their level of biofilm production. Sixteen strains (40%) were strong biofilms producers, whereas 8 (20%) and 7 (17.5%) were moderate and weak-producing strains, respectively. Nine strains (22.5%) were not biofilm producers.

The strains were identified by their phenotypic features and by molecular assays. The phenotypic identification was made using Bergey's Manual, and the results showed a similarity percentage higher than 90%. The main genus found was *Vibrio*, and in particular, *V. alginolyticus*. The molecular identification yielded the same results, although it was not species-specific, as high percentages of similarity (100%) between two or more species were found. In addition, the M28 strain was identified as *Photobacterium damsela* subs. *Damsela* with a 100% of similarity, making this the first report of this species in the scallop cultures from Huaynuma Bay.

The genus *Vibrio*, and in particular *V. alginolyticus*, is the main responsible for the primary settlement which leads to the formation of biofouling in Peruvian scallop cultures.

**Keywords:** Biofilm, marine bacteria, 16S rDNA, Peruvian scallop (*Argopecten purpuratus*), *Vibrio alginolyticus*.

# I. INTRODUCCIÓN

El medio marino constituye el hábitat más grande de la biosfera, debido a que contiene más del 97% del total de agua que forma la hidrósfera por el cual se le considera como el ecosistema más extenso del planeta porque cubre alrededor del 70% de la superficie de la Tierra, albergando la mayor abundancia y diversidad de microorganismos acuáticos, que están asociados a factores de concentración de sales minerales, nutrientes, nivel de pH, presión y temperatura; la variación de estos factores depende de la profundidad o la zona oceánica en el que se encuentra (Reyes, 2012).

Por su parte las aguas del océano pacífico (sobre todo a nivel del mar peruano) presentan diversas características que hacen posible la existencia de una gran diversidad de organismos marinos responsables de su color marrón-verdoso en los diferentes niveles tróficos, dichas características son: la variación de las temperaturas (17 a 19 °C en verano y de 13 a 14 °C en el invierno), afloramientos marinos, vientos alisios, etc. (IMARPE, 2017).

La riqueza de organismos marinos, hizo posible que la acuicultura peruana se desarrolle significativamente en los últimos años, sin embargo, se basa principalmente en la producción de: la “trucha arcoíris” (*Onchorynchus mykiss*), la “concha de abanico” (*Argopecten purpuratus*) y el “langostino blanco” (*Litopenaeus vannamei*). El Perú es el segundo productor de *A. purpuratus*, cuyos principales países de destino son: Francia, Estados Unidos y Bélgica. Esta producción se ha ido acrecentando en los últimos años, generando un incremento significativo en la exportación, su producción abarca las zonas de Ica, Ancash y Piura, representando esta última el 75% de toda la producción-. (MINCETUR, 2010; PRODUCE, 2016; FAO, 2005).

Las cosechas registradas de *A. purpuratus* en los últimos diez años estuvieron sujetas a variaciones con bajas e incrementos significativos en su producción, así por ejemplo

en el 2006 fue de 12,337 TM (toneladas métricas); en el 2013 fue de 67,694 TM, en el 2015 fue de 23,029 TM (DIREPRO, 2015) y en el 2016 donde se cosechó 20, 975 TM (PRODUCE, 2016). Estas variaciones están sujetas a los cambios de temperatura del agua y de las corrientes originadas por el fenómeno del Niño, el cual se ve reflejado en una disminución en los ingresos generados a la economía peruana por parte de las exportaciones de “concha de abanico”, siendo las cifras registradas en el 2006 de 470,933 US\$ (dólares estadounidense); en el 2013 de 159, 361,021 US\$, en el 2015 el valor disminuyó a 80, 980,322 US\$ (Oficina de estadística, 2016) y finalmente en el 2016 fue de 77, 300,483 US\$. (PRODUCE, 2016). Estas cifras ponen en evidencia que existe una relación directa entre las cosechas y los ingresos de las exportaciones de “concha de abanico” (PRODUCE, 2016)

Sin embargo existen causas desfavorables en la cosecha de este molusco, siendo principalmente la formación del *biofouling* en las linternas de cultivo, el cual origina serios problemas tanto en el cultivo como en el ecosistema (Loayza, 2011). Una linterna de cultivo acumula en promedio unos 87 kg de *biofouling* en un tiempo de 2,5 a 3 meses, los organismos que conforman el *biofouling* compiten con las “conchas de abanico” por los nutrientes del medio marino, este aspecto aún no ha sido cuantificado y que por tanto no se han determinado las pérdidas económicas en relación a la competencia por alimento (Loayza, 2011).

El *biofouling* es una acumulación indeseada de depósitos orgánicos micro y macroscópicos, sobre una superficie sumergida o que se encuentra en contacto con el agua de mar donde pueden llegar y quedar retenidas diferentes tipos de partículas. Esta acumulación o incrustación obedece a un modelo de sucesión, iniciado por un proceso de adsorción macromolecular, seguido por colonización bacteriana y epibiontes unicelulares que desarrollan una matriz polimérica, en sustratos vivos y no vivos, y finalmente promueven la colonización del *macrofouling* (presencia de organismos eucariotas) (Marquina y Santos, 2010; Su *et al.*, 2008, Loayza, 2011),

asimismo puede alterar el flujo de agua (Sharp *et al.*, 2006), disminuyendo de esta manera el suministro de alimento (Villarroel *et al.*, 2004), la disponibilidad de oxígeno y la depuración de los residuos metabólicos (Loayza, 2011), afectando negativamente el crecimiento de los organismos en cultivo (Navarro, 2001).

Flemming (2002), considera que el origen de la formación del *biofouling* es la formación de biopelículas o *biofilms* por parte de bacterias marinas, por lo que se genera la necesidad de identificar a las bacterias responsables y/o participantes de este fenómeno, sin embargo en nuestro país son pocos los estudios orientados en este tema y hasta la fecha solo se conocen tres estudios sobre la diversidad de especies presentes en estos sistemas de cultivo (Pacheco y Garate, 2015; Encomendero *et al.*, 2006; Loayza, 2014).

Sin embargo es primordial determinar y clasificar las bacterias que poseen estas cualidades, para ello se utiliza generalmente el método de adherencia en microplaca de 96 pocillos, el cual permite clasificar bacterias en diferentes grupos de acuerdo a su producción de *biofilm*. Este método es ampliamente utilizado debido a su flexibilidad para ser adaptado a las condiciones de cualquier grupo bacteriano. Asimismo a su facilidad y bajo costo que lo han convertido en un método fundamental en el estudio de *biofilm* (O'Toole, 2011).

Por lo expuesto, es necesario identificar las bacterias que poseen la capacidad de producir *biofilm* y que sean capaces de adherirse a superficies de equipos utilizados en cultivos de este molusco, que es el objetivo principal de esta investigación ya que la mayoría de las estrategias *antifouling* están dirigidas a eliminar los microorganismos en la primera etapa de su formación, contribuyendo así una reducción directa del *biofouling* y de manera indirecta los impactos perjudiciales generados en el medio marino de nuestro país.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 El ambiente marino y los microorganismos

Los microorganismos del medio marino forman una parte importante del recurso biológico del planeta, pese a esto, un gran porcentaje permanece sin ser identificado (Giovanonni, 2002), sin embargo la abundancia microbiana en los océanos, representan el sistema ecológico más grande del mundo, en ella habitan aproximadamente  $3.6 \times 10^{28}$  microorganismos a una densidad promedio de  $5 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> (Cock *et al.*, 2010), siendo solamente el 0,25% ( $10^6$ ) de microorganismos cultivables. Este porcentaje puede ser variable si se tiene en cuenta factores que podrían garantizar una mayor concentración de microorganismos en las matrices en estudio, tales como: método de aislamiento, medio de cultivo, temperatura, tiempo de incubación, entre otros. (Lugioyo, 2003; Miravet, 2003). Asimismo la abundancia de comunidades microbianas en este medio son muy diversas debido a que los microorganismo se originaron en un mismo ambiente y han evolucionado gracias a las adaptaciones fisiológicas exitosas que desarrollaron (Hellweger *et al.*, 2014).

### 2.2 Bahía de Huaynuma - Casma

La bahía de Huaynuma, conocida también como bahía Guaynuma se encuentra ubicada al noreste de la Punta Guaynuma, al oeste de la localidad Las dos Hermanas y al sureste de Playa Quitacalzón con Latitud de 9° 20' 44.2" (9.3456°) sur y Longitud: 78° 25' 24.9" (78.4236°) oeste (<https://mapcarta.com/es/25465156>).

El valor promedio de sus parámetros fisicoquímicos y biológicos son los siguientes: Temperatura (17.7 °C), Salinidad (35.018 ups), pH (min. =8.28; máx.=8.37), Oxígeno (7.85 mg/L), Fosfatos (3.21 µM), Silicatos (18.16 µM), Nitratos (9.09 µM), Nitrito (0.75 µM), sólidos suspendidos (33.19 mg/L), aceites y grasas (0.89 mg/L), DBO<sub>5</sub> (2.54

mg/L), coliformes totales (min. =2 <; máx. =18 NMP/mL), coliformes totales termotolerantes (min. =2 <; máx. =18 NMP/mL) (IMARPE, 2015).

Actualmente, se sabe que estos factores influyen en la calidad de la hidrografía de un sistema, ya que pueden alterar el metabolismo y la tasa de ingestión de los organismos superiores (Rodhouse y Roden 1987).

### 2.3 Concha de abanico “*Argopecten purpuratus*”

En el Perú existen alrededor de 11 especies de pectínidos, sin embargo la maricultura peruana recae principalmente en la producción de *A. purpuratus* o comúnmente llamada “concha de abanico” (Maeda-Martinez, 2002).

Su distribución en Sudamérica es muy amplia, sin embargo su mayor concentración abarca desde Paíta - Perú (5°S, 81°W) hasta, Valparaíso - Chile (37°S, 73°W), involucrando varias bahías como la Bahía de Huaynuma (Casma) (Wolff y Mendo, 2000; IMARPE, 2008). Esta distribución se ve influenciado por diversos parámetros (Tabla 1).

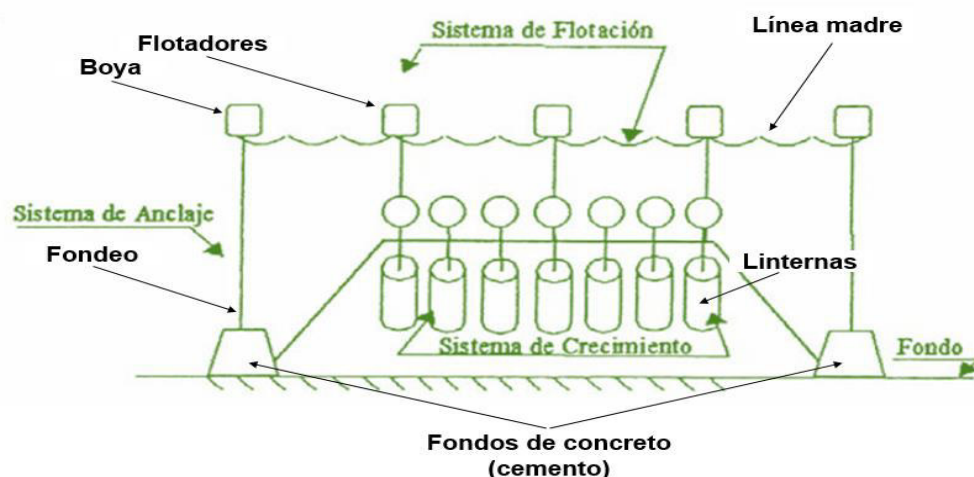
**Tabla 1.** Valores máximos y mínimos de los parámetros fisicoquímicos implicados en los cultivos de concha de abanico.

Parámetro	Valor mínimo	Valor máximo	Autor
<b>Profundidad</b>	2 m	40 m	(Valdivieso y Alarcón, 1985)
<b>Temperatura</b>	12 °C	25 °C	(Osorio, 2002)
<b>[O<sub>2</sub>]</b>	0.2 mL/L	8,0 mL/L	(PRODUCE, 2004)
<b>Velocidad de la corriente</b>	3 cm/segundo	25 cm/segundo	(PRODUCE, 2004)
<b>Salinidad</b>	33 %	35 %	(Aguirre, 2009)
<b>pH</b>	7.4	7.8	(Córdova, 2016)



El cultivo de este molusco en el Perú ha generado altos valores en la exportación y empleos laborales directos e indirectos a nivel nacional (PRODUCE, 2010). En el 2017 los valores de extracción de “concha de abanico” fue superior al 65 %, respecto a otros productos marinos (PRODUCE, 2017). En el 2018, la cosecha acuícola tuvo un incremento del 3.1% respecto al año anterior, debido principalmente a la producción de “concha de abanico”. Para el 2019, se estima que la producción del sector acuícola crecería en 6.8%, impulsado principalmente por las cosechas de “concha de abanico” (PRODUCE, 2019).

Las técnicas de cultivo más frecuente son: cultivo de fondo (tiempo de cosecha es 22 meses) y cultivo suspendido o *Long – line* (tiempo de cosecha es de 15-17 meses, **Figura 1**) (PRODUCE, 2004; PRODUCE, 2010).



**Figura 1.** Cultivo de concha de abanico suspendido en el fondo marino (cultivo *Long-line*). Compuesto por tres sistemas: 1. *Sistema de flotación* (formado por boyas y flotadores); 2. *Sistema de anclaje* (formado principalmente por material de concreto) y 3. *Sistema de crecimiento* (formado principalmente por *Pearl Nets* y linternas de cultivo). Fuente: PRODUCE, 2004.

La obtención de semillas de “concha de abanico” en el Perú puede efectuarse en el ambiente natural o en laboratorios de incubación y producción (*hatcheries*).

Es importante señalar que la presencia del fenómeno del Niño de alta intensidad es un factor favorable para el cultivo de “concha de abanico”, ya que en temporadas de ausencia y presencia se presentaron fluctuaciones muy acentuadas, aumentando

marcadamente su población y producción en presencia de este fenómeno (Wolff y Mendo 2000).

### **2.3.1 Microorganismos asociados a moluscos bivalvos**

Debido a su condición de filtradores, los moluscos se consideran como organismos bioacumuladores de bacterias y virus, donde muchos de ellos pueden actuar como agentes patógenos para los organismos marinos y para el humano. Por estas razones, el estudio de MO (microorganismos) asociados al cultivo de concha de abanico es un campo que se va desarrollando cada vez más (Pujalte *et al.*, 1999; Prieur *et al.*, 1990).

Existen dos grupos principales de MO asociadas a moluscos bivalvos: (a) MO residente; aquellos que son propios del hospedador y que no tienen ningún efecto del ambiente y (b) MO de transición; aquellos que varía según los factores medioambientales en los que habita el hospedador, siendo estos últimos aquellos que cumplen un rol importante durante el ciclo de vida de los bivalvos (Prieur *et al.* 1990; Grimes *et al.*, 2009).

## **2.4 Bacterias marinas**

Gran parte de las bacterias marinas son heterótrofas, debido a que poseen la capacidad de mineralizar o degradar la materia orgánica del medio y transferir esta energía a otros niveles tróficos, volviéndose así uno de los grupos más importantes en el funcionamiento de los ecosistemas (Kirchman, 2000).

Estudios realizados a la fecha para caracterizar la diversidad bacteriana en diferentes ambientes marinos se basan en suponer de que las técnicas tradicionales para el aislamiento permiten recuperar el mayor número de microorganismos presentes en una muestra, sin embargo solo el 0.1 y 10% de las bacterias presentes en dicha muestra son cultivables en condiciones de laboratorio (Handelsman *et al.*, 2004).

Pese a ser considerados actualmente como el grupo que constituye una parte importante de los recursos biológicos del planeta, cumpliendo un rol importante en los ecosistemas y de constituir una fuente de amplia biodiversidad, el mayor porcentaje de los microorganismos marinos permanecen sin identificación (Giovanonni, 2002).

Los géneros bacterianos más frecuentes del medio marino que se encuentran asociados a moluscos bivalvos son: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, entre otras menos frecuente. Muchos de estos géneros bacterianos, bajo ciertas condiciones de estrés en el hospedador, pueden llegar a ser patógenos y causar mortalidades (Pujalte *et al.*, 1999; Antunes *et al.*, 2010 y Romalde *et al.*, 2014), siendo el género *Vibrio* uno de los géneros más estudiados y en los que se ha podido identificar bacterias a nivel de especies (Romalde *et al.*, 2014).

## **2.5 Género *Vibrio***

La clasificación taxonómica de la familia *Vibrionaceae* ha sido modificada muchas veces por ser un grupo muy heterogéneo, siendo la siguiente, la última clasificación.

**Dominio:** bacteria (Woese)

**Filo:** Proteobacteria (Stackebrandt *et al.*, 1988)

**Clase:** Gammaproteobacteria (Garrity *et al.*, 2005)

**Orden:** Vibrionales (<http://www.bacterio.cict.fr/index.html>)

**Familia:** Vibrionaceae (Verón, 1965)

**Género:** *Vibrio* (Pacini, 1854)

La clasificación de *Vibrio* a nivel de género varía según el autor: según el Manual de Bergey (2005), se considera 3 géneros dentro de esta familia: *Vibrio* (44 especies), *Photobacterium* (6 especies) y *Salinivibrio* (1 especies); por su parte Gómez-Gil *et al.*

(2014) consideran 6 géneros que albergan 131 especies repartidas entre *Vibrio*, *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Enterovibrio*, *Grimontia* y *Aliivibrio*.

Las especies del género *Vibrio* generalmente viven en ambientes marinos, son heterótrofas, bacilos pequeños curvos gramnegativos, móvil por la presencia de un flagelo polar, donde la mayoría son de vida libre y rápido crecimiento, sin embargo algunas especies necesitan medios de alta salinidad para crecer. La salinidad óptima para el crecimiento de *Vibrio* suele estar en rangos de 2,0 a 2,5% (peso/ volumen) de NaCl (cloruro de sodio), pero esta concentración puede variar hasta 10% de NaCl en especies halófilas y a concentraciones mínimas en especies no halófilas como *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* o *Vibrio hispanicus* (www.bacterio.net) (Gomez-Gil *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004; Koneman *et al.*, 2006).

Las bacterias del género *Vibrio* son autóctonos de ambientes marinos, salobres, estuarinos y de temperatura de 17 a 20 °C. Las formas de vida más comunes en las que se encuentran son: (a) planctónica; en la columna de agua y (b) bentónica; desarrollando *biofilm* en sedimentos, sin embargo también se encuentran en el zooplancton y en el tracto gastrointestinal de diversos organismos marinos (Vezzulli *et al.*, 2015; Heidelberg *et al.*, 2002; Watnick *et al.*, 2001). En lugares templados, el género *Vibrio* se encuentran en altas densidades durante todo el año y la concentración tiende a ser mayor en los meses cálidos generando un aumento en la acumulación de estas bacterias en moluscos filtradores y otros organismos marinos, por este motivo han sido extensamente estudiados en los sistemas costeros por su importancia en el ambiente e incidencia en la extracción de moluscos (Grimes *et al.*, 2009; Pujalte *et al.*, 1999; Thompson y Polz, 2006).

Se conoce que diversas especies de *Vibrio* son patógenos para el hombre y para diversos organismos acuícolas, así por ejemplo, en los humanos se conoce alrededor de 10 especies que pueden causar diferentes tipos de patología, siendo los más peligrosos: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, por su parte en

organismos marinos las especies de *Vibrio* implicadas son: *V. anguillarum* (distribución mundial), *V. splendidus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* (en España, Canadá, Italia o Brasil), *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae no-O1*, *V. mimicus*, *V. metschnikovii*, *V. vulnificus* y el *V. hollisae* (en Venezuela) (Romalde *et al.*, 2014; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2012).

Existen reportes de diversas especies del género *Vibrio* que son patógenos asociados específicamente a ejemplares de *A. purpuratus*, así por ejemplo en larvas de este organismo se reportaron especies de *Vibrio* como: *V. anguillarum*, *V. tubiashii*, *V. splendidus* y *V. alginolyticus* (Rojas *et al.*, 2016 y Riquelme *et al.*, 1995); en adultos de *A. purpuratus*, los aportes hasta la fecha evidencian que el aumento de la temperatura del agua y la variación del fitoplancton genera una variación en la presencia de *Vibrio* en los bancos naturales (Riquelme *et al.*, 1995).

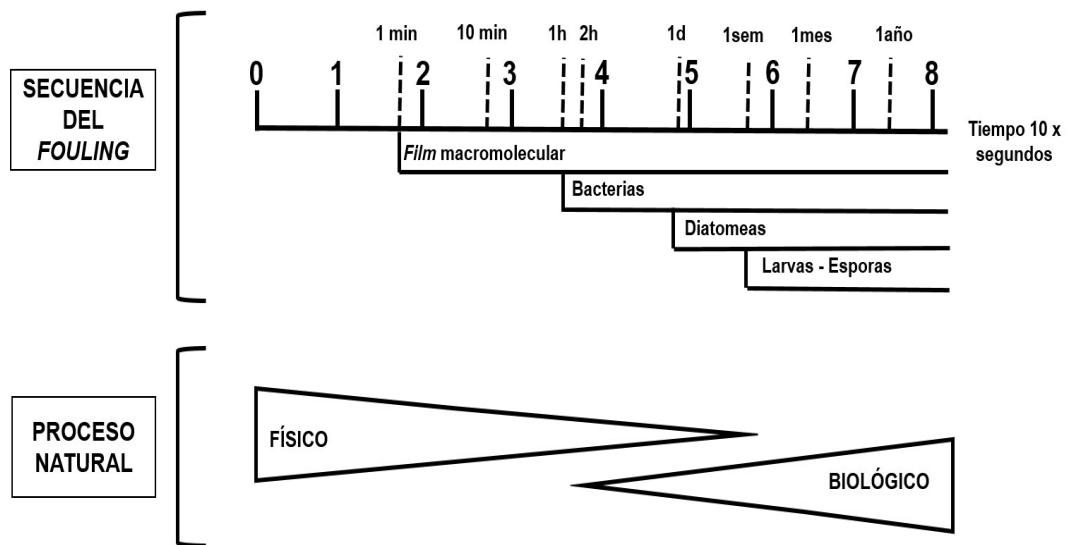
## **2.6 El biofouling**

El *biofouling* o bioincrustación es un fenómeno natural no deseado en el cual se depositan microorganismos sobre una superficie sólida (viva o muerta) en un proceso de colonización sobre un medio acuoso. Esta colonización involucra organismos marinos que crecen y se desarrollan adheridos a diferentes superficies orgánicas e inorgánicas (Wahl, 1989). La acumulación inicial de este proceso es llevado a cabo por microorganismos, los cuales producen compuestos que son conocidos como *biopelículas o biofilms* (Characklis y Briers, 1990).

El *biofouling* presenta dos aspectos: (a) positivos, porque favorecen el desarrollo de diversos organismos marinos y (b) negativos, porque afectan sistemas industriales instalados en el océano, como en el cultivo de “concha de abanico”, ya que origina problemas en el ecosistema y en las linternas del cultivo, donde este último sufre severos daños porque una vez establecido el *biofilm*, es difícil poder erradicarlo (Kjelleberg *et al.*, 2005; Flemming, 2002; Loayza, 2011).

### 2.6.1 Etapas de desarrollo del *biofouling*

El *biofouling* o asentamiento de superficies se compone por procesos físicos, químicos y biológicos, los cuales se desarrollan en una serie de etapas que se superponen en el tiempo. Este proceso inicia cuando se sumerge una superficie en el medio marino, después de 1 a 10 min empieza un acondicionamiento bioquímico, seguido de una colonización bacteriana realizado en cuestión de horas. Unas semanas después comienza la colonización de organismos eucariontes multicelulares como diatomeas. Finalmente las larvas y organismos más complejos se adhieren en cuestión de meses completando la formación del *biofouling*, el cual alcanzará un máximo desarrollo a partir de un año en adelante (**Figura 2**), (Wahl, 1989).



**Figura 2.** Secuencia de etapas del desarrollo del *biofouling*. Fuente: Wahl, 1989.

#### 2.6.1.1 Acondicionamiento bioquímico

Se realiza la adsorción de compuestos químicos (macromoléculas), cuando la superficie entra en contacto con el medio acuoso (inmersión). Este proceso se realiza en interfaces (sólido/líquido, líquido/aire), siendo completamente un proceso físico y espontáneo, sin embargo es considerado como una fase

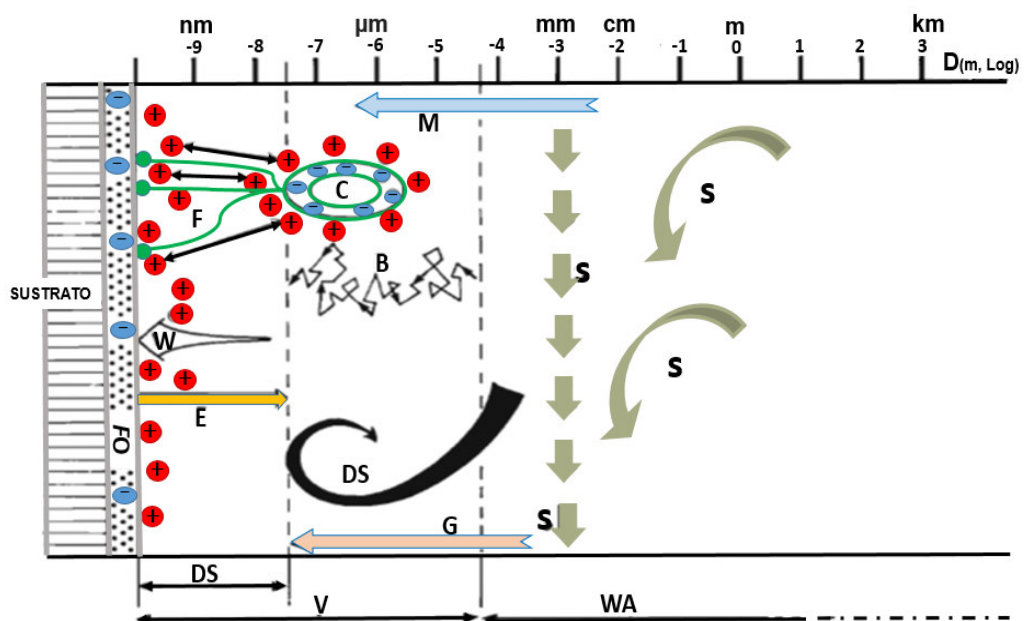
primordial para una posterior colonización de micro y macroorganismos, ya que facilita la interacción entre moléculas de las membranas celulares con la superficie para su adhesión (Wahl, 1989).

#### **2.6.1.2 Colonización bacteriana**

Está compuesta por dos procesos (**Figura 3**), el cual inicia siendo un proceso reversible (adsorción), pero con el paso del tiempo se vuelve una interacción irreversible (adhesión), el cual esta mediado por diferentes fuerzas físicas, tales como: movimiento browniano (B), electrostática (E), gravedad (G), fuerzas de Van der Waals (W) y fuerzas de uniones específicas.

Cuando una superficie sólida se sumerge en un medio acuoso se rodea de moléculas de agua que forman una “capa viscosa” (*film*), generalmente de 40-100  $\mu\text{m}$  de ancho, la cual actúa como un obstáculo cuando una partícula (bacteria) se aproxima a la superficie para unirse a ella, por lo que no existirá una unión total, sin embargo esta “capa viscosa” puede ser penetrada por factores como: microturbulencias (DS, “*Down Sweeps*”), motilidad bacteriana (M) o por difusión, cuando esto ocurre, interactúan las fuerzas físicas entre la superficie y la bacteria, haciendo que ambas se carguen negativamente y de esta manera actúan las fuerzas antagónicas y de atracción, logrando así inmovilizar a las bacterias a una distancia de 3-20 nm de la superficie. Esta barrera electrostática puede ser el puente para que la bacteria empiece la producción de fibrillas de mono y polisacáridos (principalmente fructosa), las cuales al encogerse jalarán a la bacteria hacia la superficie. De la misma manera existen uniones covalentes entre el glicocálix bacteriano (exudado polimérico extracelular) y el *film* macromolecular desde la fase de adsorción hasta la fase de adhesión (Wahl, 1989).

Los factores transcendentales para el proceso de fijación (adhesión bacteriana), son los siguientes: (a) las propiedades del sustrato cuyas características como: hidrofobicidad, hidrofiliidad, rugosidad y los *film* juegan un papel importante en la fijación de la bacteria a la superficie, (b) secreción de exopolisacáridos (EPS) y (c) la presencia de apéndices bacterianos, principalmente pilis tipo I y flagelos, que ayudan a las células bacterias a superar las fuerzas físicas, iniciando así el proceso de colonización (Wall y Kaiser, 1999).



**Figura 3.** Proceso de colonización bacteriana sobre una superficie. Fuente: Wahl, 1989.

Cuando una célula bacteriana localiza una posible fuente de nutrientes se acercan mediante mecanismos de quimiotaxis, tal es el caso de MO litótrofos y autótrofos que presentan capacidad de oxidar hierro (Fe II) colonizarán con facilidad superficies industriales del medio marino que contienen este elemento en su composición, por consiguiente serán las principales responsables de la corrosión, convirtiéndose en una etapa crucial en el desarrollo posterior del *fouling* (Flemming, 2002).



Todos estos sucesos son parte del proceso de adherencia y constituirán el “*film*” primario del proceso de formación del *fouling*, y por ser una acumulación de compuestos y de organismos vivos es denominada como “*biofilm*”, por tanto “*biofouling*” (Wahl, 1989).

#### **2.6.1.3 Colonización de eucariontes unicelulares**

Después de varios días de inmersión y cuando el *biofilm* ya está establecido empieza la adherencia (colonización, depósito y andamiaje) de células eucariotas (levaduras, protozoos y algas, siendo estas últimas las predominantes), las cuales en conjunto formaran el armazón del *biofouling* (Wahl, 1989).

La adherencia de los diferentes tipos de organismos sobre las superficies responde a diferentes mecanismos, por ejemplo las diatomeas (algas unicelulares) se adhieren secretando exopolisacáridos (EPS) (Callow y Callow, 2002). En el caso de los cirrípedos como *Semibalanus balanoides* y *Balanus amphitrite*, la adherencia se da por un complejo proteico inductor del asentamiento (SIPC), cuya composición es principalmente glicoproteínas cuticulares (proteínas que forman las capas externas en algunos crustáceos) (Matsumura *et al.*, 1998).

#### **2.6.1.4 Colonización de eucariontes multicelulares**

Varias semanas después de la inmersión de la superficie en el medio acuoso los microorganismos que lo recubren adoptan estructuras tridimensionales, que darán origen al desarrollo del *macrofouling*, cuya composición estaría basada en dos tipos de *biofouling*: blando y duro. El desarrollo del *macrofouling* empieza con la formación del “*biofouling* blando”, el cual comprende el asentamiento de algas e invertebrados como corales blandos, esponjas, anémonas y tunicados, debido a que estos organismos requieren

necesariamente de una superficie para completar su ciclo vital. Inmediatamente después se da inicio a la formación del “*biofouling* duro” que está compuesto por invertebrados superiores, tales como; cirrípedos, moluscos y gusanos vestibulares. En este contexto es importante mencionar que los organismos que pueden desarrollarse en el *biofouling* dependen en gran medida de factores como la localización geográfica, temporada del año, selección específica (interacción entre organismo-sustrato) y otros factores relacionados con predación y competencia (Callow y Callow, 2002).

La adhesión puede darse en diferentes sustratos, diversos rangos de temperatura, salinidad y aún en condiciones de turbulencia. Este proceso comprende dos etapas: (a) adhesión reversible; denominada así porque le permite al organismo moverse alrededor del sustrato hasta encontrar un lugar óptimo de asentamiento. Al contacto inicial de la adhesión se denomina “*First Kiss*”, lo que vendría a ser el proceso de selección de los organismos que estarán presentes en el *biofouling*, esta selección se realiza mediante señales específicas de atracción o repulsión entre todos los organismos involucrados, al terminar este proceso se dará inicio a la (b) adhesión irreversible, la cual empieza con el asentamiento del resto de invertebrados marinos, convirtiéndose así en una estructura sólida adherida a una superficie (Callow y Callow, 2002).

## **2.7 El *biofilm***

Actualmente el *biofilm* está definido como “Una comunidad microbiana sésil caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o a una interfase, englobadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) producidas por ellas mismas y que exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica” (Donlan, 2002). Cuando esta organización celular se desarrolla en cualquier tipo de superficie adquiere ventajas metabólicas y de

sobrevivencia ya que es considerado como un tipo de mecanismo de resistencia (física y química) altamente elaborada, dinámica y compleja, debido a la variedad de microorganismos presentes y que interactúan entre sí. El desarrollo de la adhesión se verá grandemente favorecida por la producción de EPS, que les permitirá a las bacterias soportar condiciones de hambruna y competencia, asimismo poder asimilar mejor los nutrientes presentes en el medio (Passmore y Costerton, 2003).

La formación de *biofilm* es considerado como una forma de vida universal de los microorganismos, el cual les ha permitido adaptarse a diversas comunidades y nichos ecológicos, tales como; suelos, sedimentos, minerales, superficies de plantas, glaciares, volcanes, conductores eléctricos (electrodos) y áreas altamente irradiadas de plantas nucleares. Sin embargo la presencia de estas estructuras no corresponden solo a épocas actuales debido a que también se han encontrado *biofilms* fosilizados que pertenecen a inicios de la formación de la tierra, con una antigüedad de hasta 3.5 billones de años, demostrando de esta manera que son la forma de vida más exitosa (Flemming, 2002).

### **2.7.1 Etapas del desarrollo del *biofilm***

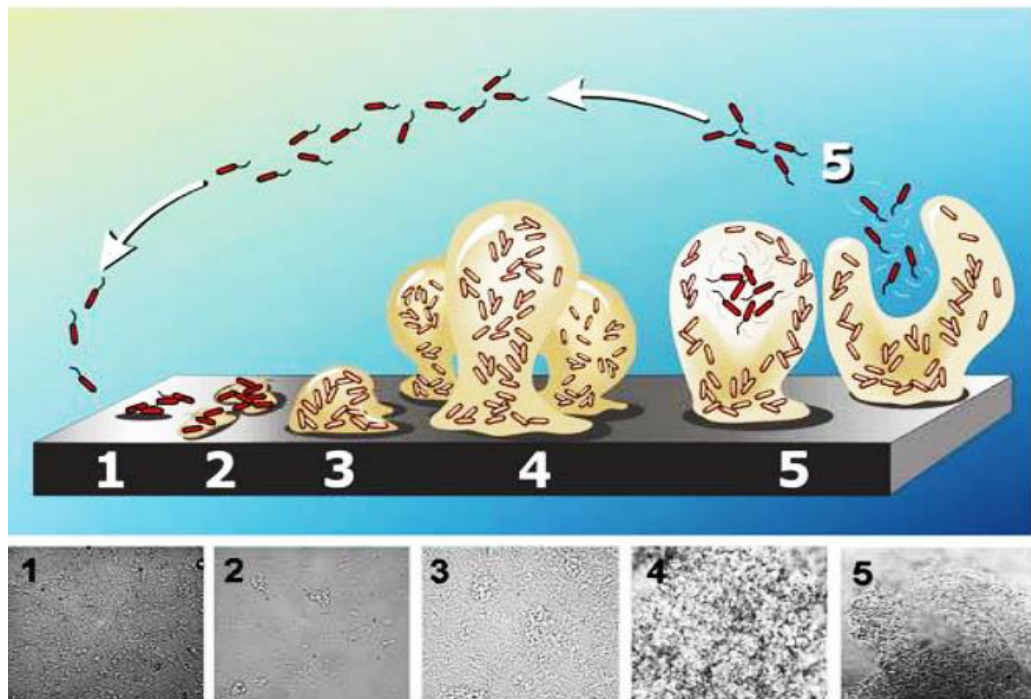
Cuando una bacteria pasa de su estado planctónico a un estado sésil pasa por diferentes etapas (**Figura 4**), en las que sufre cambios que involucra dos factores: (a) Inespecífico, compuesto por interacciones físicas, químicas y eléctricas (responsables de los acondicionamientos descritos en el *biofouling*) y (b) Específicos, que involucra adhesinas y apéndices bacterianos, las cuales pueden variar según la especie bacteriana y el medio en que se desarrollan (Santos, 2010). El desarrollo del *biofilm* sigue las siguientes etapas:

#### **2.7.1.1 Adhesión a una superficie:**

Cuando las bacterias entran en contacto con una superficie inerte o un tejido vivo desarrollan estrategias y cambios para unirse a dichas superficies, los

cambios desarrollados son principalmente de tipo fisiológicos, con los cuales se convertirán en bacterias totalmente diferente a su estado planctónico, porque empezarán a expresar una gran cantidad de proteínas y estructuras bacterianas (Nazcar, 2007; Marquina y Santos, 2010).

En el caso de bacterias Gram negativas el mecanismo más utilizado para iniciar la adhesión es mediante flagelos, fimbrias y los pilis tipo IV (estructuras filamentosas, numerosas, y rígidos, conformada por subunidades de pilina, que les confieren resistencia a la tensión mecánica y a la tracción para disponerse sobre las superficies (Kaiser, 2000; Li y Craig, 2008; Marquina y Santos, 2010).



**Figura 4.** Etapas del desarrollo de un *biofilm* bacteriano. 1, Adhesión a una superficie. 2, División celular y formación de colonias. 3, Secreción de sustancias poliméricas extracelulares. 4, Formación de canales y 5, Maduración y salida de células para colonizar otras superficies. Fuente: Marquina y Santos, 2010.

### **2.7.1.2 División y formación de colonias**

Cuando las bacterias han logrado adherirse a la superficie se desprenden de sus estructuras que ya no utilizaran (flagelos, fimbrias y pilis), y comienzan a dividirse extendiéndose en toda la superficie formando una colonia hasta alcanzar una concentración celular mínima (Marquina y Santos, 2010).

### **2.7.1.3 Secreción de sustancias poliméricas extracelulares**

Una vez que las bacterias han alcanzado una concentración celular adecuada, empiezan a secretar sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que les servirá como adhesivos en la formación de la estructura tridimensional típica. La composición de estas sustancias son principalmente alginatos, celulosas, poli-N-acetil-glucosamina y otros polisacáridos extracelulares, pero varían según el tipo de microorganismo que los producen, así por ejemplo: *P. aeruginosa* produce alginato, *S. typhimurium* produce celulosa, *S. aureus* produce poli-N-acetil-glucosamina y en el caso de bacterias del género *Vibrio* producen sustancias conocidas como limo. Los EPS son el componente más abundante que forma parte de la estructura del *biofilm*, ya que constituyen entre el 50-90% del total de material orgánico. Su composición se basa principalmente en macromoléculas como los polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, restos de células bacterianas y en menor proporción, sales minerales, partículas de sedimento y en general componentes del medio en el que se forma los cuales favorecen su síntesis. Debido a la gran cantidad de EPS producidos por las células bacterianas, empezaran a rodearse por la misma quedando unidas por más tiempo sobre la superficie dando como resultado una adhesión irreversible y de esta manera quedará completada la formación del *biofilm* (Costerton *et al.*, 1995; O'Toole *et al.*, 2000; Marquina y Santos, 2010).

#### 2.7.1.4 Formación de canales

Terminado la formación del *biofilm* se produce la diferenciación celular bacteriana entre la zona basal (inferior) y la apical (superior). Las células de la zona basal mueren por la falta de oxígeno y nutrientes, permitiendo así la creación de canales dentro del *biofilm* para que se produzca la recircularización de sustancias que permitirá la nutrición del *biofilm* en todas sus capas celulares y como consecuencia desarrollarán una estructura tridimensional, es decir un *biofilm* maduro (Marquina y Santos, 2010).

#### 2.7.1.5 Maduración y salida de células para la formación de un nuevo *biofilm*

Una vez que el *biofilm* ha alcanzado un espesor determinado empieza la última etapa en la cual las células bacterianas de la zona apical entran a un procesos de diferenciación celular, de tal forma que se desprenden de la matriz de exopolímeros y migran hasta alcanzar un nuevo soporte al que se adhieren empezando así un nuevo proceso de colonización (O'Toole *et al.*, 2002 y Marquina y Santos, 2010). Estos desprendimientos responden a diferentes mecanismos, siendo los más importantes:

- **Primero (fuerzas externas de la corriente)**, que arrastra fragmentos de la estructura del *biofilm*, esta debilidad podría estar relacionado por la deficiencia nutricional (Donlan, 2002).
- **Segundo (programación genética)**, que hace que las células bacterianas se desprendan en forma de cúmulos, muchos de estos causados por enzimas secretadas por las mismas que degradan los EPS (O'Toole y Kolter 1998; Shapiro *et al.*, 1998).
- **Tercero:** Por colisión de partículas del líquido con el *biofilm* que finalmente terminan en una abrasión (Donlan, 2002).

La regulación del proceso de producción y secreción de EPS están controlados por procesos de *Quorum Sensing* (tipo de comunicación entre células bacterianas mediante sustancias bioquímicas) la cual regula la expresión genética en respuesta a fluctuaciones de la densidad de la población bacteriana (Hentzer *et al.*, 2002 y Marquina y Santos, 2010).

## **2.8 Efectos del *biofilm* y *biofouling* en la industria**

El desarrollo del *biofilm* y *biofouling* pueden acarrear efectos positivos y negativos para el medio ambiente, el hombre y otros organismos. Así por ejemplo el *biofilm* puede dar lugar a efectos indeseables, pero a su vez puede ser utilizado en la industria como matriz de inmovilización celular para la producción de compuestos como vitaminas y antibióticos, entre otros (UICN, 2007). Sin embargo la presencia del *biofilm* no solo tiene importancia en la industria, sino también en la salud debido a que pueden desarrollarse en instrumentos médicos, trasplantes e incluso en órganos del ser humano, causando infecciones crónicas cuyo tratamiento con antibióticos tendría una concentración de hasta quinientas veces más de que si fuera por una infección de microorganismos en estado planctónicos (Costerton *et al.*, 1995; Stoodley *et al.*, 2002).

Por su parte el *biofouling* acelera el desgaste de los instrumentos utilizados en la acuicultura, tales como; boyas, *pearl nets*, linternas y bolsas colectoras en el caso de captación de ejemplares. Asimismo el *biofouling* añade un peso extra a las estructuras flotantes, reduciendo su resistencia, que conlleva una alza en los costos de mantenimiento, disminución de la productividad, sin embargo es importante mencionar que la gravedad de los problemas asociados al *biofouling* depende de la intensidad de sus factores (geográficos, ambientales, estación del año, etc.). (UICN, 2007).

## **2.9 ADN ribosomal 16S**

También denominado ARN ribosomal 16S o ARNr 16S, contiene aproximadamente 1.500 nucleótidos, a partir de la cual se obtienen secuencias con información

filogenética y taxonómica, estas pueden ser; altamente conservados (comunes a todos los organismos), y secuencias específicas “oligonucleótidos firma” (comunes a determinados grupos filogenéticos) (Rodicio y Mendoza, 2004).

El análisis molecular de identificación bacteriana utilizando las secuencias del ADNr 16S incluye básicamente tres etapas: (a) Amplificación: se amplifican las secuencias del ADNr 16S utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (b) Determinación de las secuencias: obtención de electroferogramas. (c) Análisis de secuencia: se compara la secuencia del ADNr 16S con las que se encuentran depositadas en bases de datos (Rodicio y Mendoza, 2004).



### III. HIPÓTESIS

En el medio marino existen especies bacterianas cultivables productoras de *biofilm* asociadas a la formación del *biofouling* en cultivos de “concha de abanico” (*Argopecten purpuratus*), en la bahía de Huaynuma, Casma – Perú.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general:

- Identificar bacterias productoras de *biofilm* asociadas a la formación del *biofouling* en cultivos de “concha de abanico” (*Argopecten purpuratus*), en la bahía de Huaynuma, Casma – Perú.

### 4.2 Objetivos específicos:

- Aislar bacterias marinas productoras de *biofilm* adheridas en las mallas del cultivo de “concha de abanico” (*Argopecten purpuratus*).
- Evaluar bacterias marinas según su producción de *biofilm*.
- Identificar fenotípica y molecularmente bacterias marinas productoras de *biofilm*.
- Comparar la cantidad y diversidad de bacterias marinas fuertemente productoras de *biofilm* aisladas e identificadas de la temporada verano con la temporada primavera.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Material biológico

##### 5.1.1.1 Bacterias marinas aisladas

Bacterias marinas aisladas a partir del sustrato (malla L1) proveniente de zonas de cultivo de “*Argopecten purpuratus*”.

##### 5.1.1.2 Cepas bacterianas de referencia

##### Cepas bacterianas empleadas en la evaluación de la adherencia

- Cepas de *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749, adquirida por el proyecto INNOVATEPERU-PIAP-2015 del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP).
- Cepas de *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, cedida por el Laboratorio de Biotecnología del ITP.
- Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, adquirida por el proyecto INNOVATEPERU-PIAP-2015 del ITP.
- *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 cedida por el Laboratorio de Biología Marina de la Universidad Federal de Río de Janeiro (Sao Paulo, Brasil).

##### Cepas bacterianas empleadas en las pruebas bioquímicas

- Cepas de *Proteus vulgaris*, cedida por el Laboratorio de Microbiología del ITP.
- Cepas de *Escherichia coli*, cedida por el Laboratorio de Biotecnología del ITP.
- Cepas de *Listeria sp*, cedida por el Laboratorio de Microbiología del ITP.

- Cepas de *Staphylococcus aureus*, adquirida por el proyecto INNOVATEPERU-PIAP-2015 del ITP.

## **5.2 Metodología**

### **5.2.1 Aislamiento de bacterias marinas proveniente de zonas de cultivo de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*)**

#### **5.2.1.1 Lugar de colección de muestras y ejecución del estudio**

Las muestras biológicas fueron colectadas en dos muestreos y en dos temporadas diferentes (verano y primavera) en la Bahía de Huaynuma, ciudad de Casma, región Áncash, Perú (Km. 383.3 de la Carretera Panamericana Norte) y procesadas en los laboratorios del ITP.

#### **5.2.1.2 Toma de muestra**

Para la toma de muestra se empleó malla L1 (15 x 15 cm<sup>2</sup>), como sustrato para la adherencia bacteriana, para ello la malla se esterilizó previamente con luz UV durante 15 minutos y se colocó dentro de una bolsa ziploc, seguidamente se transportó al lugar de muestreo donde se ubicó en la línea madre del cultivo *Long-line* (aproximadamente a 7 metros de profundidad) de las instalaciones del campo acuícola ACUALTURA Y PESCA S.A.C, (coordenadas 9°20'49.3"S – 78°25'41.1"W) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Ubicación geográfica de las coordenadas de los puntos de muestreo en la Bahía de Huaynuma o Guaynuma – Casma, Perú.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS			
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS			
ESCUELA PROFESIONAL DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA			
TESIS: IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE BIOFILM PRESENTES EN LA FORMACIÓN DEL BIOFOULING EN CULTIVOS DE "CONCHA DE ABANICO" ( <i>Argopecten purpuratus</i> ), EN LA BAHÍA DE HUAYNUMA, CASMA – PERÚ			
TITULO: MAPA DE UBICACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO			
AUTOR: GONZALES BERNABEL, EVELIN ELIZA			MAPA U-01
PROYECCION: UTM		DATUM: WGS 84	
ESCALA:	1:60 000	FORMATO: A4	
FECHA : MARZO - 2017			

<b>PUNTO DE MONITOREO</b>			
<b>SISTEMA DE COORDENADAS</b>		<b>COORDENADAS GEOGRÁFICAS</b>	
PROYECCIÓN:	UTM		
DATUM :	WGS84		
ZONA GEOGRÁFICA:	17 S		
782505.54	E	9°20'49.3"	S
8965750.71	S	78°25'41.1"	WO

Ambos muestreos se realizó bajo las mismas condiciones. Para garantizar la esterilidad las bolsas ziploc conteniendo el sustrato (malla L1) fueron abiertas en el mismo punto de muestreo (dentro del agua) para evitar alguna posible contaminación por manipulación o por microorganismos del medio ambiente, ajenos a lo que se busca. Pasado las 24 h la malla se guardó en un frasco ámbar estéril y finalmente fue transportada a las instalaciones del ITP.

### **5.2.1.3 Aislamiento de bacterias marinas**

La muestra fue enjuagada dos veces con agua de mar estéril, luego cortada en trozos y llevada a un frasco ámbar de boca ancha con caldo de cultivo SWT (Sea Water Triptona) en condiciones estériles. Finalmente se incubó a temperatura ambiente (22 °C) y 150 rpm durante 5 días.

Para el aislamiento, se realizó hisopado, enjuague y diluciones seriadas de la muestra (**Figura 6 y 7**), para ellos previamente se dividió en dos grupos: a) las bacterias que se encontraban adheridas a la malla y b) las que se encontraban suspendidas en el caldo de cultivo.

Para el grupo a, se realizó un hisopado y una suspensión inmediata en agua de mar estéril, a partir del cual se realizó 5 diluciones seriadas (1/10). Para el grupo b, se tomó 0.5 ml del caldo de cultivo y se realizó una dilución más respecto al grupo anterior, debido a que la concentración de solutos fue mayor, es decir se realizó 6 diluciones seriadas en agua de mar estéril (1/10). Cada grupo se inoculó por diseminación en agar SWT y fueron incubados a 22 °C de 24 a 48 horas (hasta observar colonias desarrolladas).



**Figura 6.** Hisopado de la muestra (malla L1) y enjuague con agua de mar estéril



**Figura 7.** Dilución de la muestra (caldo de cultivo) en solución salina.

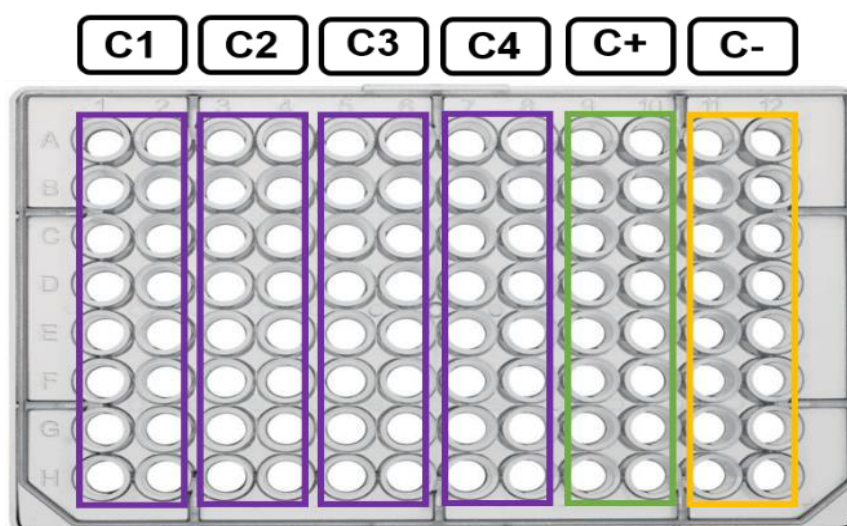
Como criterio de selección de los cultivos a estudiar, las cepas bacterianas que se aislaron fueron tomadas a partir de las placas de recuento (colonias aisladas). Estas cepas fueron aisladas hasta obtener un cultivo axénico con sucesivos repiques (tercera generación) en agar SWT. A este nivel se realizó una tinción Gram presuntiva para garantizar la pureza de cada cepa (Gram, 1884), finalmente las bacterias se conservaron en dos tipos de ceparios; cepario de trabajo indirecto y directo. El cepario de trabajo indirecto se conservó por triplicado en microtubos con medio semisólido SWT más glicerol

al 20 % (v/v) a 4 °C. (León, *et al.* 2010), a partir de las cuales se elaboraron los ceparios de trabajo directo, que fueron conservados en tubos inclinados con medio SWT y almacenados a 15 °C.

Cabe mencionar que cada prueba que se realizó, se trabajó a partir de cultivos *overnight* (células jóvenes), para ello se hizo una reactivación previa y estriado en agar SWT a 22 °C durante 24 h.

### 5.2.2 Evaluación de la adherencia y producción de *biofilm*

La evaluación de adherencia y producción de *biofilm*, se realizó utilizando la metodología de Stepanovic *et al.*, 2007 con algunas modificaciones, para ellos se seleccionó una a más colonias (según el tamaño de esta) de un cultivo *overnight* en placa con agar SWT y se realizó una suspensión bacteriana en tubos de 15x100 mm con 5 mL de solución salina al 0.85 % a una concentración celular de  $5 \times 10^8$  o 0.5 Mac Farland, paralelamente se esterilizaron las placas (microplaca de poliestireno blancas de 96 pocillos) con luz UV durante 15 min. Finalmente se añadieron 20 µL de solución bacteriana más 180 µL de caldo SWT a cada pocillo de la placa (16 pocillos por cepa) de forma ordenada (**Figura 8**).



**Figura 8.** Distribución de las muestras y controles en cada placa. C1, C2, C3 y C4 (cepas bacterianas), C+ (control positivo) y C- (control negativo).



Como control positivo y negativo se utilizaron; la cepa de *V. alginolyticus* y caldo SWT respectivamente. Así mismo, también se utilizó *V. parahaemolyticus* como control negativo para corroborar los resultados obtenidos. Finalmente las placas con la solución bacteriana se incubaron a 22 °C por 24 h.

Luego de la incubación se vació el contenido de la placa en un recipiente, se enjuagó con PBS para eliminar células no adheridas y los componentes del medio que podría teñirse en el siguiente paso, después de enjuagar se puso a secar a 60°C por 15 minutos. Posteriormente se adicionó cristal violeta (CV) al 1%, con la cual se fijó al calor a 60°C por 10 minutos, transcurrido el tiempo se enjuagó con agua de caño para eliminar el exceso de colorante y células no fijadas. Finalmente se agregó ácido acético al 30 % a cada pocillo para solubilizar el CV y se puso en agitación constante con 300 rpm durante 30 minutos. Las lecturas de cada placa se realizaron con un espectrofotómetro (modelo, POWERWAVE XS), utilizando el programa Gen 5 a 570 nm.

Finalmente el cálculo de los valores sobre las lecturas de cada placa se realizó de la misma forma para las cepas marinas y para las cepas utilizadas como control positivo de acorde a la fórmula utilizada por Stepanovic *et al.*, 2007.

$$(i) DO_F = \bar{X}_c + 3 \cdot SD_c$$

$$(ii) N = \bar{X}_m - \bar{X}_c$$

**Donde:**

$\bar{X}_{(m \text{ y } c)}$ : Promedio (c: caldo y m: muestra)

**SD**: Desviación estándar (c: caldo y m: muestra)

**DO<sub>F</sub>**: Densidad óptica del blanco

**N**: Adherencia

Para el cálculo se sacó el promedio y la desviación estándar de los 8 pocillos del blanco (caldo de cultivo) y de la muestra (concentración bacteriana). Por otro lado se halló el DOF para el cual se sumó al promedio del caldo 3 veces su desviación estándar, asimismo se halló el valor de la adherencia de cada bacteria para la que se restó la media aritmética del caldo a la media aritmética de la muestra.

Finalmente según los valores obtenidos en el procedimiento anterior se clasificó en cuatro grupos diferentes.

**Tabla 2.** Clasificación de cepas bacterianas en cuatro grupos según el nivel producción de *biofilm*.

VALORES	CARACTERÍSTICA
$N \geq 4DOF$	Fuertemente productora (FP)
$2DOF < N \leq 4DOF$	Moderadamente productora (MP)
$DOF < N \leq 2DOF$	Débilmente productora (DP)
$N \leq DOF$	No productora (NP)

### 5.2.3 Identificación fenotípica de bacterias fuertemente productoras de *biofilm*

Las bacterias de interés en esta investigación fueron las fuertemente productoras de *biofilm*, las cuales se trabajó las evaluaciones posteriores.

La identificación fenotípica se realizó en base a pruebas bioquímicas convencionales, y a su comportamiento cultural en medio de cultivo sólido, Así mismo se complementó con pruebas de tolerancia a la sal.

#### 5.2.3.1 Caracterización cultural

Se realizó para determinar el comportamiento cultural de cada bacteria en un medio de cultivo sólido, utilizando un agar base (Agar SWT), y un agar

selectivo (agar TCBS; Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa). La preparación y lectura de cada medio se realizó siguiendo el protocolo descrito en el manual de instrucciones de cada medio. Cada bacteria fue estriada (previa reactivación en caldo SWT) en su respectivo medio e incubada a 22 °C durante 24 - 48 h. La lectura consistió básicamente en recopilar información de sus características culturales, es decir la forma y comportamiento de cada bacteria (colonia) en cada tipo de agar. Las principales características consideradas fueron: tamaño, forma, borde, superficie, elevación, luz transmitida, consistencia, color y formación de halo (en algunos casos).

#### **5.2.3.2 Pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación fenotípica de las bacterias fuertemente productoras de *biofilm*, fueron las siguientes: Tinción Gram, Prueba del Citocromo-oxidasa, Prueba de la catalasa, Prueba de oxidación y fermentación y Prueba de Motilidad. Así mismo se utilizó medios de cultivos especiales (Agar Citrato de Simons, Voges – Poskauer (VP), caldo Rojo de Metilo (RM), medio SIM (Sulfuro, Indol y Motilidad), TSI (Agar Triple Azúcar de Hierro), LIA (Agar Hierro Lisina) y reducción de aminoácidos (Arginina, Ornitina y lisina), suplementados con NaCl al 2%), (ver Anexo).

#### **5.2.3.3 Prueba de tolerancia a la sal (Cloruro de Sodio, NaCl)**

Para esta prueba, la igual que en la prueba de evaluación de adherencia, se seleccionó una a más colonias (según el tamaño de esta) de un cultivo *overnight* en placa con SWT y se realizó una suspensión bacteriana en tubos de 15x100mm con 5 mL de solución salina al 0.85 % a una concentración celular de  $5 \times 10^8$  o 0.5 Mac Farland. Finalmente se agregó 100 µl de esta solución a tubos de caldo peptona con diferente concentración de NaCl (0 %, 0.85 %, 3 %, 6 %, 8 % y 10 %), por duplicado y se incubó a 22 °C. La lectura

y verificación del crecimiento se realizó a las 48 h. Esta prueba fue clave para considerar la originalidad de cepas y descartar una posible contaminación con bacterias del ambiente de trabajo (León, 1998).

#### **5.2.4 Identificación molecular de bacterias fuertemente productoras de *biofilm***

Así como la identificación fenotípica, la identificación molecular se realizó solamente a las cepas fuertemente productoras de *biofilm*.

##### **5.2.4.1 Preparación de la muestra y extracción del ADN**

Igual que en las pruebas anteriores se trabajó con cultivos *overnight*, pero para esta prueba las colonias bacterianas fueron seleccionadas a partir de placas con agar Luria Bertani (LB), previamente suplementada con 2 % de NaCl y el contenido se pasó a microtubos con agua de grado molecular (100 µL en c/u). Inmediatamente después se pasó a realizar la extracción del ADN genómico, mediante la técnica de colony PCR (Somer y Kashi, 2003), en la que cada tubo con la colonia bacteriana fue sometido a 90 °C y – 20°C durante 5 min y 3 min respectivamente, terminado este procedimiento se centrifugó a 8500 rpm durante 1 min. Finalmente se retiró el sobrenadante a un nuevo microtubo.

##### **5.2.4.2 Determinación de la concentración del ADN total**

La concentración y pureza de ADN se evaluó con un espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific™), a un campo de lectura de 280 nm. Se utilizó 2 µL de agua DEPC/ grado molecular como blanco y 1 µL de las muestras. Las mediciones se hicieron por triplicado para cada muestra, donde el valor final fue el promedio de las tres lecturas, que

fueron comparados con los valores de referencia del Banco Nacional de ADN Carlos III de la Universidad de Salamanca, España. (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Valores indicativos de concentración y pureza de las muestras de ADN para determinar la calidad del ADN en solución. Fuente: Banco Nacional de ADN Carlos III de la Universidad de Salamanca, España

ABSORBANCIA	VALOR	PUREZA
<b>ABS 260/280</b>	1.8-2.0	ADN de pureza óptima
	1.6-1.8	ADN de pureza aceptable
	< 1,6	ADN con presencia de compuestos aromáticos (fenoles y compuestos aromáticos)
	> 2.1	ADN con contaminación de ARN
<b>ABS 260/230</b>	1.5-2.2	ADN de alta pureza
	< 1,5	ADN contaminados con sales, carbohidratos, fenoles

#### 5.2.4.3 Amplificación del ADN

Luego de obtener el ADN genómico de las bacterias, se procedió a la amplificación del fragmento de 1.500 pb del marcador molecular ADN<sub>r</sub> 16S, utilizando los cebadores: Forward (5'-AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3') (Inbakandan *et al.*, 2014) y Reverse (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'), este cebador fue levemente modificado en regiones variables de los primer utilizando nucleótidos Y (Weisburg *et al.*, 1991). Las reacciones de PCR (*Polymerase chain reaction*), se realizó con un volumen final de 50 µL, incluyendo entre 100 a 200 ng de ADN genómico. La mezcla de reacción estuvo compuesta por: 2.5 U/µL Taq polimerasa (kit HotStarTaq DNA Polymerase Qiagen, USA), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTP y 0.3 µM de cada iniciador. Finalmente la amplificación se realizó en un termociclador con las siguientes condiciones del programa de ciclaje: Denaturación inicial a 95 °C por 5 min; 40 ciclos de denaturación a 95 °C por 30 s, hibridación a 50 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 1 min y una

extensión final a 72 °C por 10 min, para que complete la extensión del producto final de PCR.

#### **5.2.4.4 Electroforesis**

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, con un buffer TBE al 0.5 X, a 100 V, 100 A y por 45 min, seguidamente se realizó una tinción con bromuro de etidio al 0.5% por 30 minutos y una decoloración por 15 min con agua destilada. Los marcadores usados fueron: GeneRuler DNA express Ladder 1 Kb (6 µL) (Thermo Scientific). Las bandas de DNA fueron visualizadas por iluminación con luz UV y fotografiada mediante un sistema de fotodocumentación de geles (BIORAD, USA).

#### **5.2.4.5 Purificación de productos del PCR**

Los productos PCR se cortaron y purificaron empleando el kit QIAquick PCR (Qiagen, USA) de acuerdo al protocolo del fabricante.

#### **5.2.4.6 Secuenciamiento del marcador ADNr 16S**

Los productos de PCR purificados fueron enviados a secuenciar a la empresa MACROGEN (Korea).

#### **5.2.4.7 Identificación molecular**

La identificación de las secuencias obtenidas de los productos PCR de las bacterias marinas, fueron determinados por comparación de las secuencias del marcador molecular ADNr 16S y de las especies de las bacterias marinas reportadas y depositadas en la base de datos GenBank del NCBI (National Centre for Biotechnology Information). Para leer las secuencias sentido y anti-sentido se utilizó el programa CodonCode Aligner, con la que se creó una secuencia consenso con cada una de las muestras analizadas, finalmente se realizó el alineamiento de las secuencias con el programa

BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos GenBank del NCBI (National Center of Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

#### **5.2.4.8 Análisis filogenético**

Para realizar el alineamiento de las secuencias de las muestras analizadas se utilizó el programa Bioedit. El análisis filogenéticos de los datos alineados se realizó con el método de *Neighbor-Joining* (NJ) utilizando el programa MEGA 7.0 (Tamura *et al.*, 2013).

Con los datos obtenidos se construyó un árbol filogenético para cada uno de los fragmentos amplificados utilizando el método NJ, donde las distancias genéticas se calcularon con el modelo Kimura 2-parametros (Kimura, 1980). También se efectuó un análisis de "bootstrap" de 10000 repeticiones. Asimismo, se recopilaron secuencias del GenBank (National Center for Biotechnology Information) para realizar la reconstrucción filogenética.

En el análisis de la región ADNr 16S, incluyeron secuencias del género *Vibrio* depositadas previamente en el GenBank y como grupo externo se utilizó la secuencia de *Staphylococcus aureus*.

Cabe resaltar que en esta investigación se realiza una identificación polifásica, ya que se combinan criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación a base del marcador ADNr 16S (Stackebrandt, *et al.*, 2002).

#### **5.2.5 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se analizaron utilizando pruebas estadística descriptiva (media, varianza y desviación estándar). En todos los casos, se consideraron valores  $p < 0,05$  como estadísticos significativos. Finalmente con los valores obtenidos se clasificó las cepas bacterianas en cuatro grupo.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Aislamiento de bacterias a partir del cultivo de “concha de abanico”

#### *Argopecten purpuratus*

Luego del crecimiento de las bacterias marinas en agar SWT, estas fueron seleccionadas en base a sus diferencias culturales de cada colonia y codificadas según el orden de aislamiento, obteniendo finalmente un total de 40 cepas, de las cuales se observó que el 95% fueron bacterias en forma de bacilos y solo el 5% en forma cocos. **Tabla 4.** Así mismo se observó que el porcentaje de Gram negativas y Gram positivas fue de 87,5 y 12,5% respetivamente.

**Tabla 4.** Tinción Gram para bacterias marinas aisladas de la muestra (caldo y malla) en agar SWT de las dos temporadas (verano y primavera).

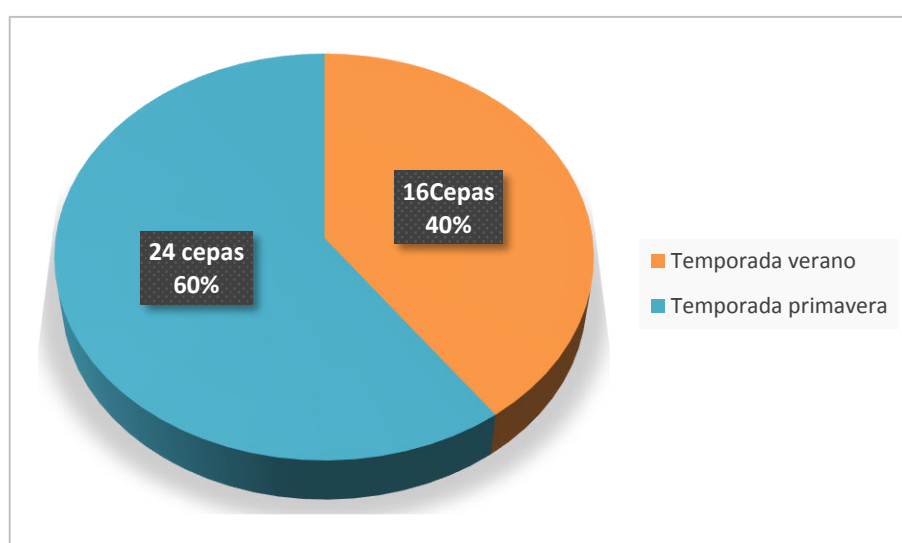
Cepa	Origen	Gram	Cepa	Origen	Gram
Verano			Primavera		
M1	Caldo	Bacilo -	CT6	Caldo	Bacilo -
M2	Caldo	Coco -	CG5	Caldo	Bacilo -
M4	Caldo	Bacilo +	CS39	Caldo	Bacilo -
M8	Caldo	Bacilo -	CS5	Caldo	Bacilo -
M9	Caldo	Bacilo -	CS48	Caldo	Bacilo -
M10	Caldo	Bacilo -	CS6	Caldo	Bacilo -
M15	Caldo	Bacilo -	CS1	Caldo	Bacilo +
M17	Malla	Bacilo -	CX21	Caldo	Bacilo -
M19	Malla	Bacilo -	CG4	Caldo	Bacilo -
M24	Malla	Bacilo -	CP7	Caldo	Bacilo +
M25	Malla	Bacilo -	CP5	Caldo	Bacilo -
M26	Malla	Bacilo +	MT4	Malla	Bacilo +
M27	Malla	Coco +	MT7	Malla	Bacilo -
M28	Malla	Bacilo -	MT8	Malla	Bacilo -
M30	Malla	Bacilo -	MG8	Malla	Bacilo -
M32	Malla	Bacilo -	MX3	Malla	Bacilo -
---	---	---	MX51	Malla	Bacilo -
---	---	---	MX54	Malla	Bacilo -
---	---	---	MX71	Malla	Bacilo -
---	---	---	MX8	Malla	Bacilo +
---	---	---	MS5	Malla	Bacilo -
---	---	---	MS6	Malla	Bacilo +
---	---	---	MP6	Malla	Bacilo -
---	---	---	MP7	Malla	Bacilo -

(+): Cepas Gram positivas, (-): Cepas Gram negativas.



Las lecturas de la Tinción Gram de las bacterias aisladas, se realizó utilizando como referencia cepas de control, las cuales fueron: *Listeria sp* (bacilo Gram +), *Vibrio alginolyticus* (bacilo Gram -), *Staphylococcus aureus* (coco Gram +) y la cepa MX71 proporcionada por el Laboratorio de Microbiología del ITP (coco Gram -). Ver imágenes en Anexo.

En la **Figura 9** se muestra la cantidad de bacterias marinas que fueron aisladas en las dos temporadas de muestreo, siendo la temporada primavera, donde se aisló el 60% del total (24 cepas) y el 40% (16 cepas) en la estación verano.



**Figura 9.** Bacterias marinas aisladas en las dos temporadas de muestreo (verano y primavera) representadas en porcentajes

## 6.2 Adherencia y producción de *biofilm*

Las bacterias aisladas de ambas temporadas fueron clasificadas en cuatro grupos de acuerdo a su producción de *biofilm* cuyos valores fueron cuantificados en el espectrofotómetro. Esta producción se pudo observar en las paredes del pocillo (bacterias móviles) y en los fondos del pocillo (bacterias no móviles).

### 6.2.1 Bacterias productoras de *biofilm*

Para contrastar los valores de adherencia obtenidos y poder clasificar las cepas aisladas, previamente se eligió una cepa de control de control positivo, la cual fue

seleccionada en base a sus valores de adherencia y producción *biofilm*, utilizando cepas bacterianas referenciadas como productoras de *biofilm* (**Figura 10, 11 y 12**).

El valor numérico de la adherencia de cada bacteria se calculó a partir de los valores obtenidos en las lecturas del espectrofotómetro, con los que se pudo caracterizar cada una de ellas de la siguiente manera: *V. alginolyticus* (ADH=1.909); cepa fuertemente productora de *biofilm*, *P. aeruginosa* (ADH=1.041) y *P. aeruginosa* PAO1 (ADH=1.459); cepas moderadamente productoras de *biofilm* y *V. parahaemolyticus* (ADH=0.254); cepa débilmente productora de *biofilm* (**Figura 13 y Tabla 5**).

**Tabla 5.** Valores de adherencia obtenidos a partir de la lectura del espectrofotómetro (absorbancia 570 nm) provenientes de las bacterias productoras de *biofilm* (controles).

CEPA	DOF	ADH (N)	CALIFICACIÓN	CLASIFICACIÓN
<i>Vibrio a.</i>	0.128	1.909	$N \geq 4DOF$	FP
<i>Vibrio p.</i>	0.128	0.254	$DOF < N \leq 2DOF$	DP
<i>Pseudomonas a.</i>	0.411	1.041	$2DOF < N \leq 4DOF$	MP
<i>Pseudomonas a.</i> <b>PAO1</b>	0.411	1.459	$2DOF < N \leq 4DOF$	MP

Medio de cultivo utilizado: Caldo SWT (*Vibrio*), caldo TSB (*Pseudomonas*)

**DOF:** Densidad óptica, **N:** Adherencia

**FP:** Fuertemente productora de *biofilm*

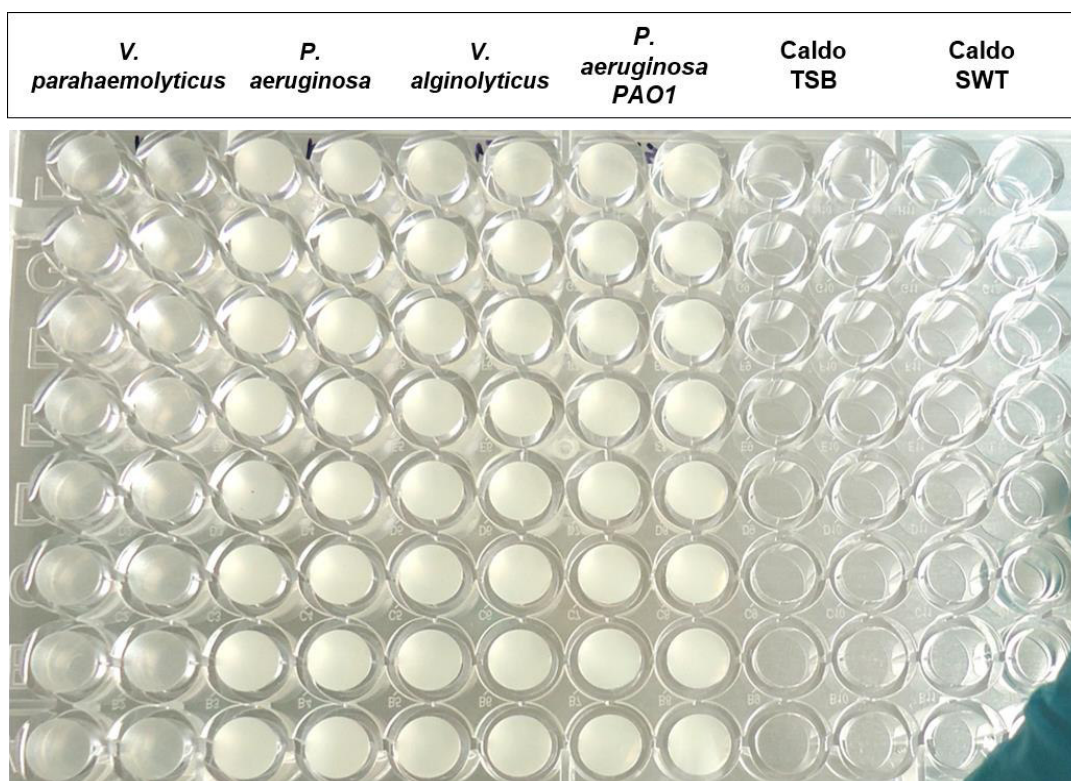
**MP:** Moderadamente productora de *biofilm*

**DP:** Débilmente productora de *biofilm*

En todos los casos, los datos de la adherencia de cada cepa se obtuvo a partir de 8 valores centrales de lecturas y los otro 8 valores de lectura más alejados fueron descartados.

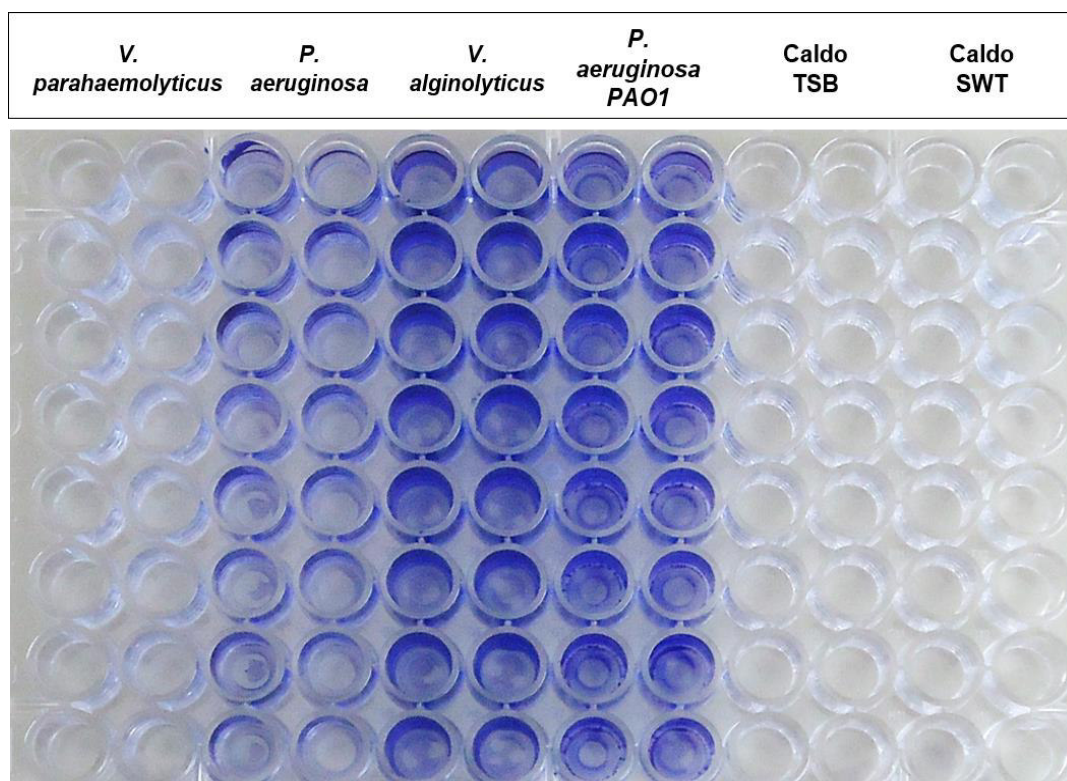
Finalmente la bacteria seleccionada como control positivo seleccionada fue *V. alginolyticus*, debido a que tuvo una mayor adherencia y producción de *biofilm* frente a las otras cepas.

En la **Figura 10**, se muestra el crecimiento por parte de las cepas productoras de *biofilm*. Asimismo es importante remarcar que la bacteria *V. parahaemolyticus* mostró una poca producción de *biofilm* comparada con la producción de las otras tres bacterias (*V. alginolyticus*, *P. aeruginosa* y *P. aeruginosa* PAO1), las cuales produjeron una gran cantidad de *biofilm*.



**Figura 10.** Producción de *biofilm* (por bacterias utilizadas como control positivo) (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *P. aeruginosa* y *P. aeruginosa* PAO1), contrastado con los controles negativos (caldo TSB para cepas de *Pseudomonas* y caldo SWT para cepas de *Vibrio*).

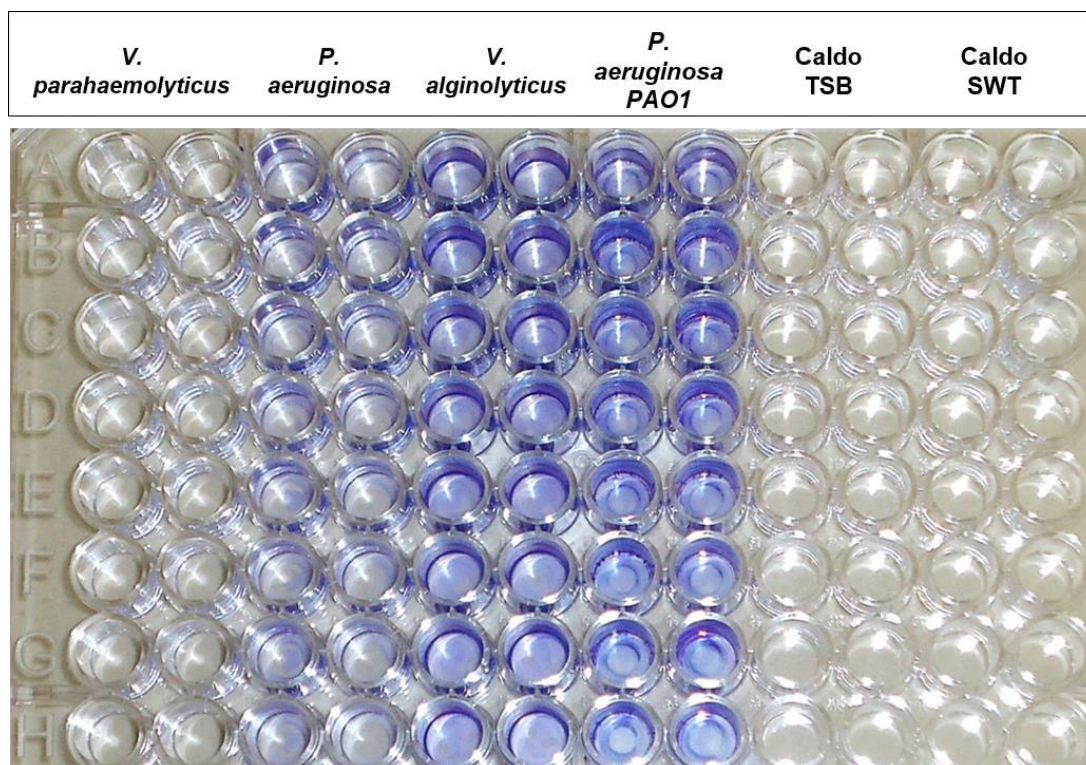
La **Figura 11** muestra la coloración de la placa con cristal de violeta al 1%, en la cual se observó diferentes niveles de coloración para cada una de las cuatro bacterias, cuyo orden (de mayor a menor intensidad de coloración) es la siguiente: *V. alginolyticus*, *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* y *V. parahaemolyticus*. En el caso de los controles negativos (caldo TSB y caldo SWT) no se observó coloración alguna.



**Figura 11.** Coloración del *biofilm* (producido por bacterias utilizadas como control positivo) coloreadas con cristal de violeta al 1%. (Stepanovic *et al.*, 2007).



La **Figura 12** muestra la resuspensión del *biofilm* (coloreadas anteriormente con cristal violeta) en ácido acético al 30%. Se observa diferentes intensidades de resuspensión, cuyo orden de mayor a menor intensidad de resuspensión es la siguiente: *V. alginolyticus*, *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* y *V. parahaemolyticus*. En el caso de los controles negativos (caldo TSB y caldo SWT) no se observa resuspensión alguna.



**Figura 12.** Resuspensión del *biofilm* (producidas por bacterias utilizadas como control positivo) en ácido acético al 30 %. (Stepanovic et al, 2007).

Una vez seleccionada la cepa control, se repitió el ensayo con las 40 cepas aisladas. Así mismo el valor de la adherencia de cada una se calculó a partir de los valores obtenidos en las lecturas del espectrofotómetro. Finalmente se pudo clasificar cada cepa en cuatro grupos según su adherencia y producción de *biofilm* (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Valores de adherencia obtenidos a partir de la lectura del espectrofotómetro (absorbancia 570 nm) provenientes de las bacterias aisladas del cultivo de “concha de abanico”

CEPA	DOF	ADH (N)	CALIFICACIÓN	CLASIFICACIÓN
<i>Vibrio a.</i>	0.128	1.909	$N \geq 4DOF$	FP
M1	0.128	1.909	$N \geq 4DOF$	FP
M8	0.132	2.52	$N \geq 4DOF$	FP
M15	0.138	2.409	$N \geq 4DOF$	FP
M17	0.129	1.921	$N \geq 4DOF$	FP
M24	0.129	3.017	$N \geq 4DOF$	FP
M25	0.139	0.97	$N \geq 4DOF$	FP
M28	0.139	1.198	$N \geq 4DOF$	FP
M30	0.125	1.889	$N \geq 4DOF$	FP
M32	0.129	2.507	$N \geq 4DOF$	FP
CG5	0.125	3.518	$N \geq 4DOF$	FP
CS39	0.125	3.36	$N \geq 4DOF$	FP
CS5	0.132	1.073	$N \geq 4DOF$	FP
MX51	0.153	2.589	$N \geq 4DOF$	FP
MP7	0.156	2.083	$N \geq 4DOF$	FP
MT7	0.125	1.305	$N \geq 4DOF$	FP
MT8	0.13	4.874	$N \geq 4DOF$	FP
M10	0.138	0.548	$2DOF < N \leq 4DOF$	MP
M19	0.13	0.445	$2DOF < N \leq 4DOF$	MP
MX71	0.156	0.617	$2DOF < N \leq 4DOF$	MP
MS6	0.12	0.469	$2DOF < N \leq 4DOF$	MP
CS48	0.156	0.609	$2DOF < N \leq 4DOF$	MP
CP7	0.12	0.462	$2DOF < N \leq 4DOF$	MP
CT6	0.132	0.482	$2DOF < N \leq 4DOF$	MP
CS6	0.127	0.31	$2DOF < N \leq 4DOF$	MP
M4	0.144	0.24	$DOF < N \leq 2DOF$	DP
M26	0.144	0.281	$DOF < N \leq 2DOF$	DP
MX3	0.143	0.274	$DOF < N \leq 2DOF$	DP
MX54	0.138	0.251	$DOF < N \leq 2DOF$	DP
MG8	0.138	0.2477	$DOF < N \leq 2DOF$	DP
CG4	0.132	0.188	$DOF < N \leq 2DOF$	DP
CS1	0.129	0.169	$DOF < N \leq 2DOF$	DP
M2	0.132	0.02	$N \leq DOF$	NP
M9	0.138	0.015	$N \leq DOF$	NP
M27	0.125	0.018	$N \leq DOF$	NP
CX21	0.143	0.023	$N \leq DOF$	NP
CP5	0.129	0.128	$N \leq DOF$	NP
MS5	0.153	0.135	$N \leq DOF$	NP
MX8	0.148	0.076	$N \leq DOF$	NP
MP6	0.148	0.121	$N \leq DOF$	NP
MT4	0.148	0.077	$N \leq DOF$	NP

**DOF:** Densidad óptica, **N:** Adherencia

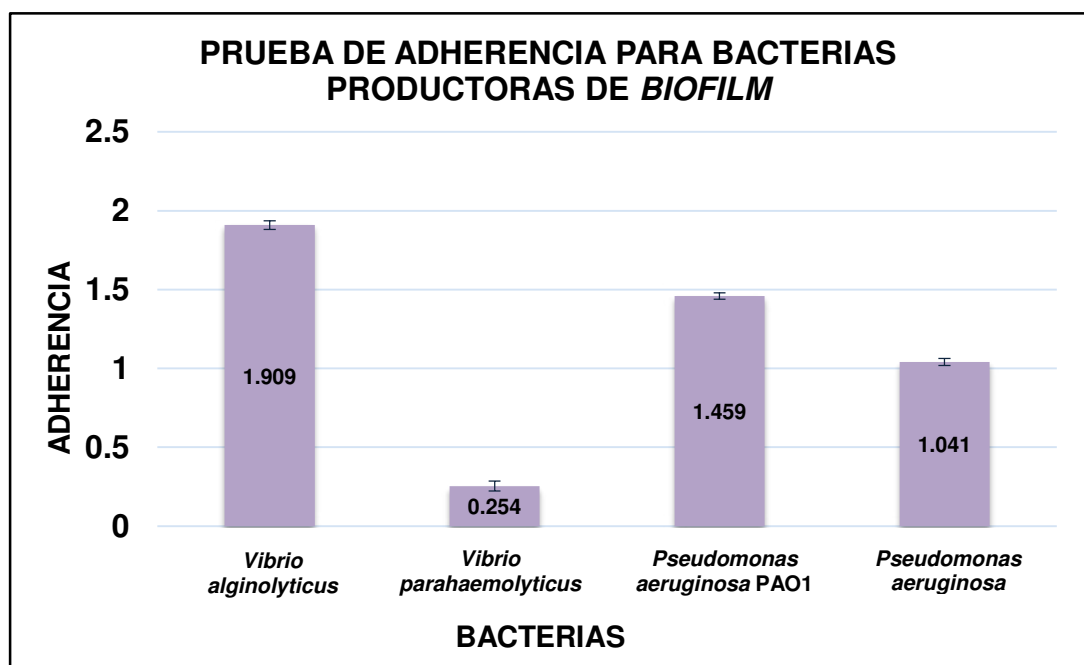
**FP:** Fuertemente productora de *biofilm*

**MP:** Moderadamente productora de *biofilm*

**DP:** Débilmente productora de *biofilm*

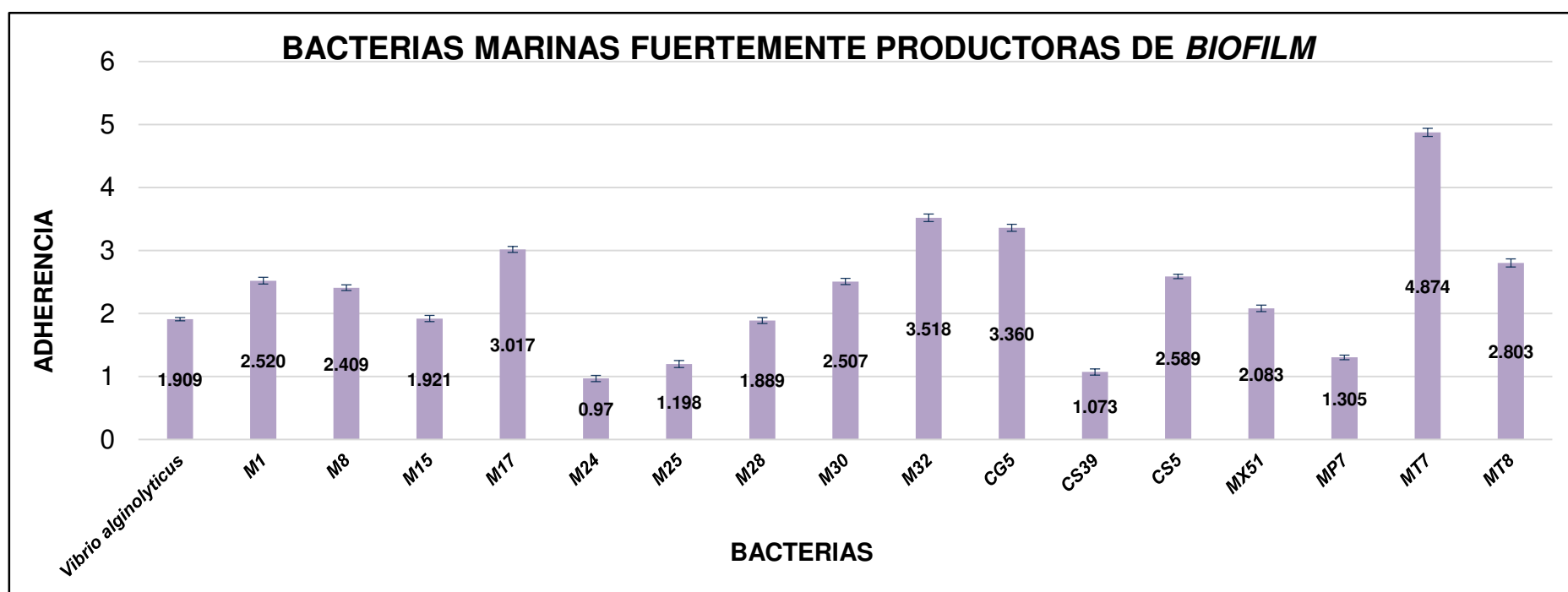
**NP:** No productora de *biofilm*

En la **Figura 13** se muestra los valores de la adherencia de las cepas bacterianas referentes como productoras de *biofilm*, calculados a partir de las lecturas del espectrofotómetro. El mayor valor de adherencia fue de *V. alginolyticus* (ADH=1.909), clasificada como fuertemente productora de *biofilm* (FP), seguido por valores intermedios de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* (ADH=1.459 y ADH=1.041, respectivamente), calificadas como moderadamente productoras de *biofilm* (MP), finalmente el menor valor de adherencia fue de *V. parahaemolyticus* (ADH=0.254), calificada como débilmente productora de *biofilm* (DP).



**Figura 13.** Valores de adherencia de las bacterias productoras de *biofilm*. Se muestran las barras de desviación estándar para cada valor de adherencia.

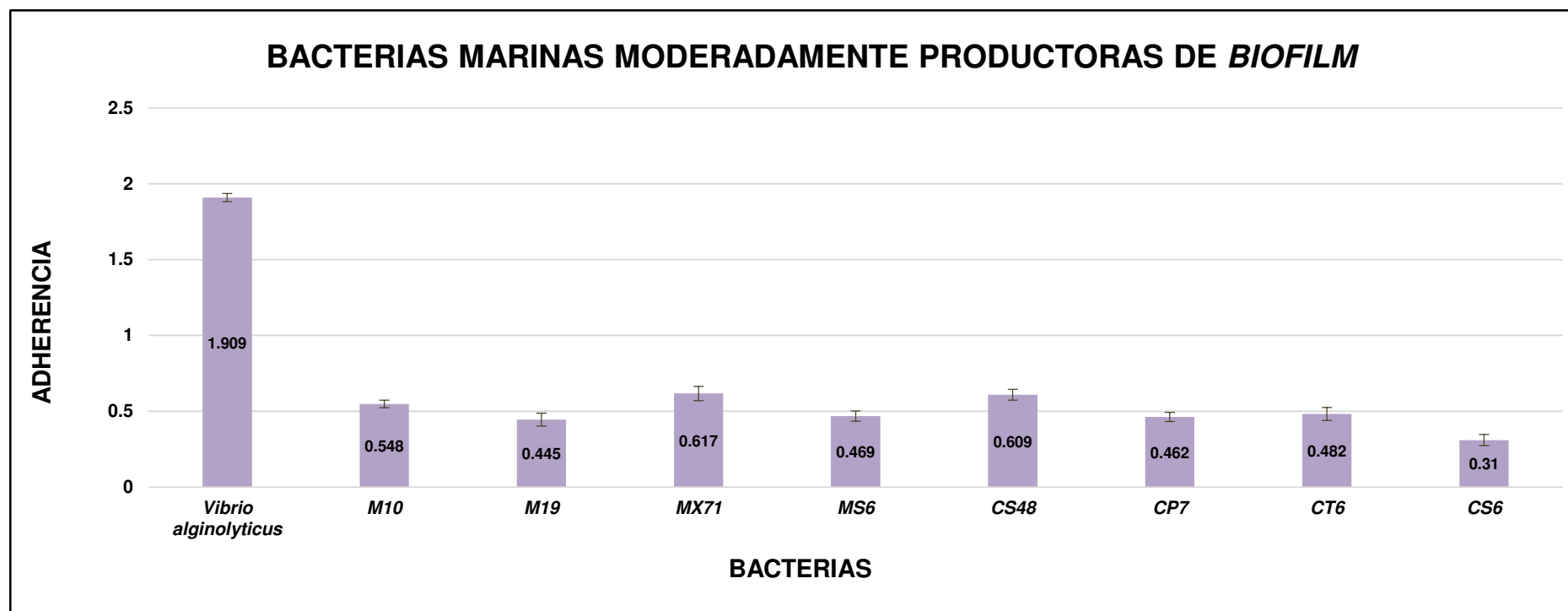
La **Figura 14** muestra las barras de adherencia construidas con los valores obtenidos a partir de las lecturas del espectrofotómetro de las bacterias marinas clasificadas como fuertemente productoras de *biofilm*. El 68.75 % de este grupo presentó valores de adherencia mayor al de la cepa utilizada como control (*V. alginolyticus*), cuyo **valor máximo** fue de la cepa **MT7 (ADH=4.874)**. Por otro lado, el 35.25 % de las cepas presentó valores menores al de la cepa control, cuyo **valor mínimo** fue de la cepa **CS39 (ADH=0.97)**. Asimismo se observó que 9 cepas de bacterias marinas fueron de la temporada verano y 7 de la temporada de primavera.



**Figura 14.** Valores de adherencia de las bacterias marinas clasificadas como fuertemente productoras de *biofilm*. Se muestran las barras de desviación estándar para cada valor de adherencia.

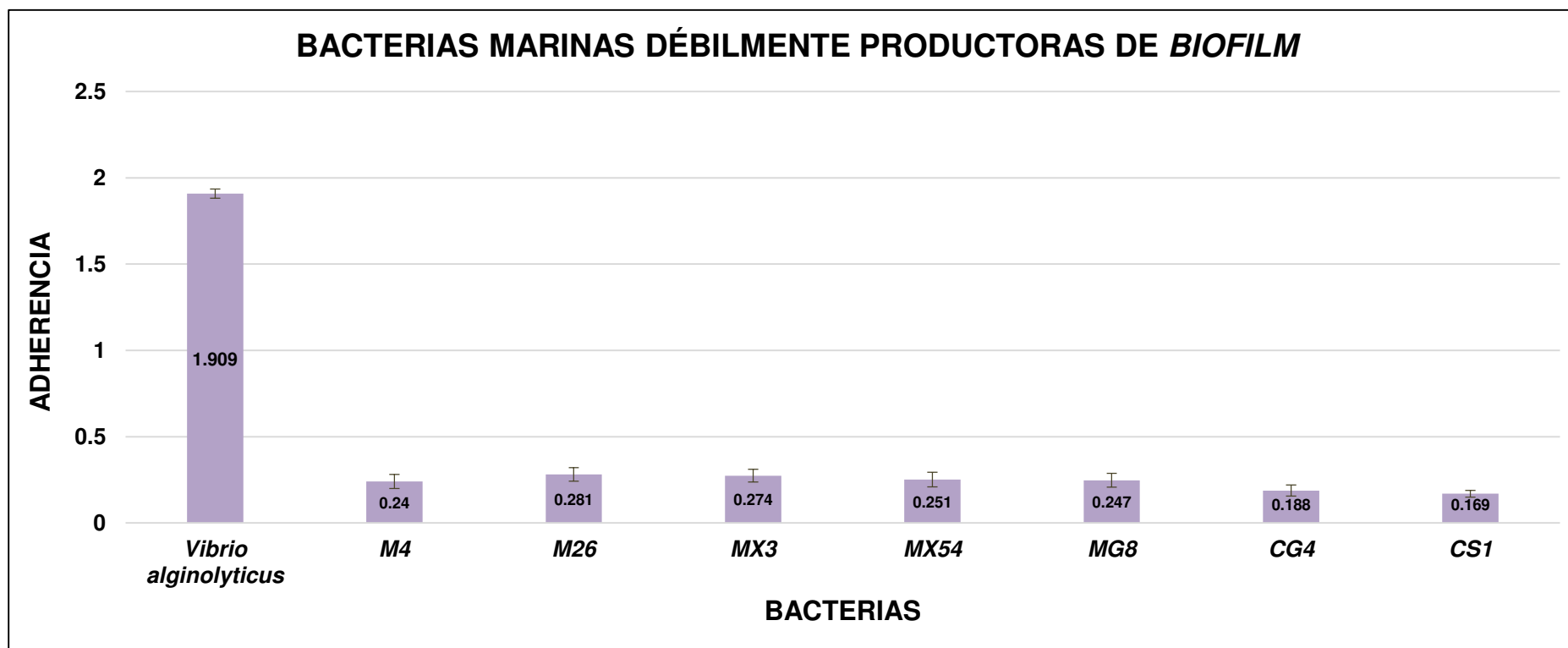


La **Figura 15** muestra las barras de adherencia construidas con los valores obtenidos a partir de las lecturas del espectrofotómetro de las bacterias marinas clasificadas como moderadamente productoras de *biofilm*. De todas las cepas clasificadas en este grupo el valor máximo de adherencia fue producido por la cepa MX71 (ADH=0.617) y el valor mínimo por la cepa CS39 (ADH=0.97).



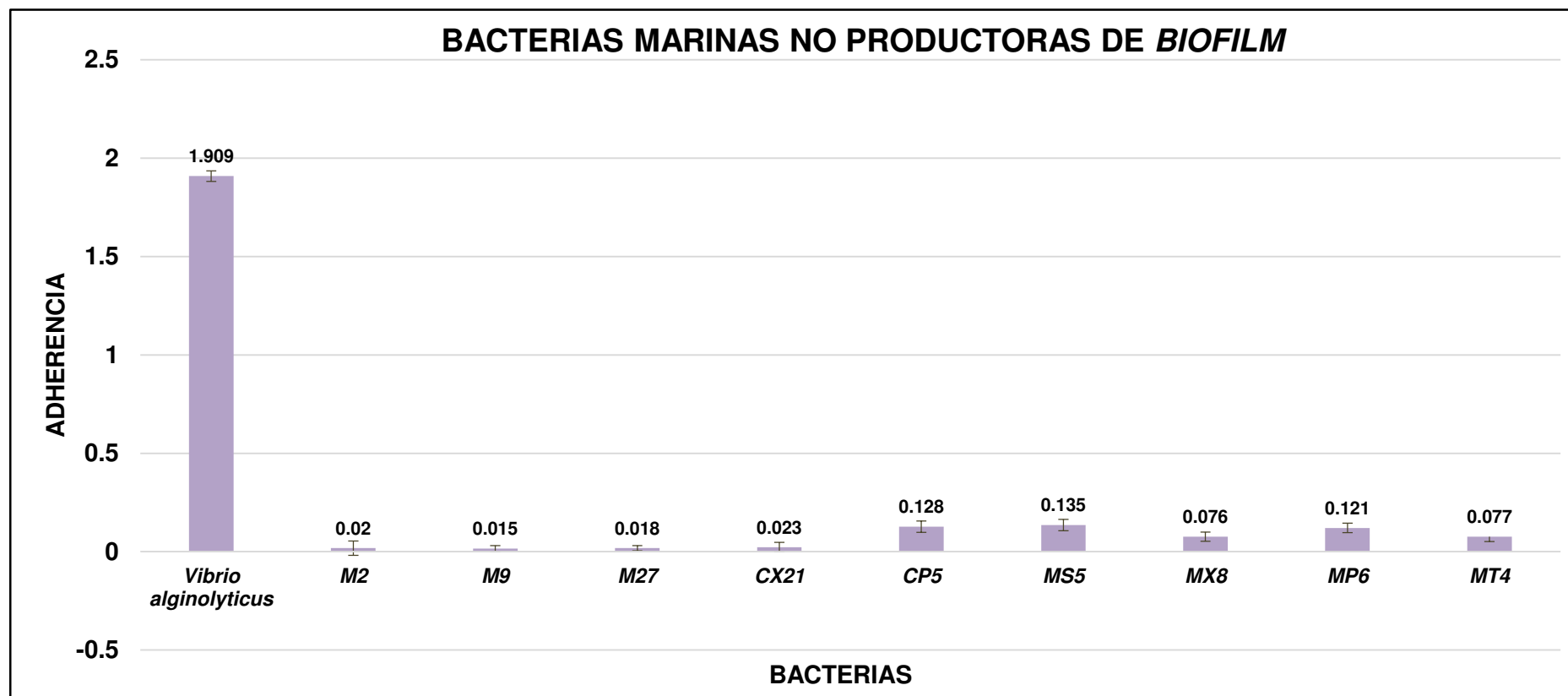
**Figura 15.** Valores de adherencia de las bacterias marinas clasificadas como moderadamente productoras de *biofilm*. Se muestran las barras de desviación estándar para cada valor de adherencia.

La **Figura 16** muestra las barras de adherencia construidas con los valores obtenidos a partir de las lecturas del espectrofotómetro de las bacterias marinas clasificadas como débilmente productoras de *biofilm*. De todas las cepas clasificadas en este grupo el valor máximo de adherencia fue producido por la cepa M26 (ADH=0.281) y el valor mínimo por la cepa CS1 (ADH=0.169).



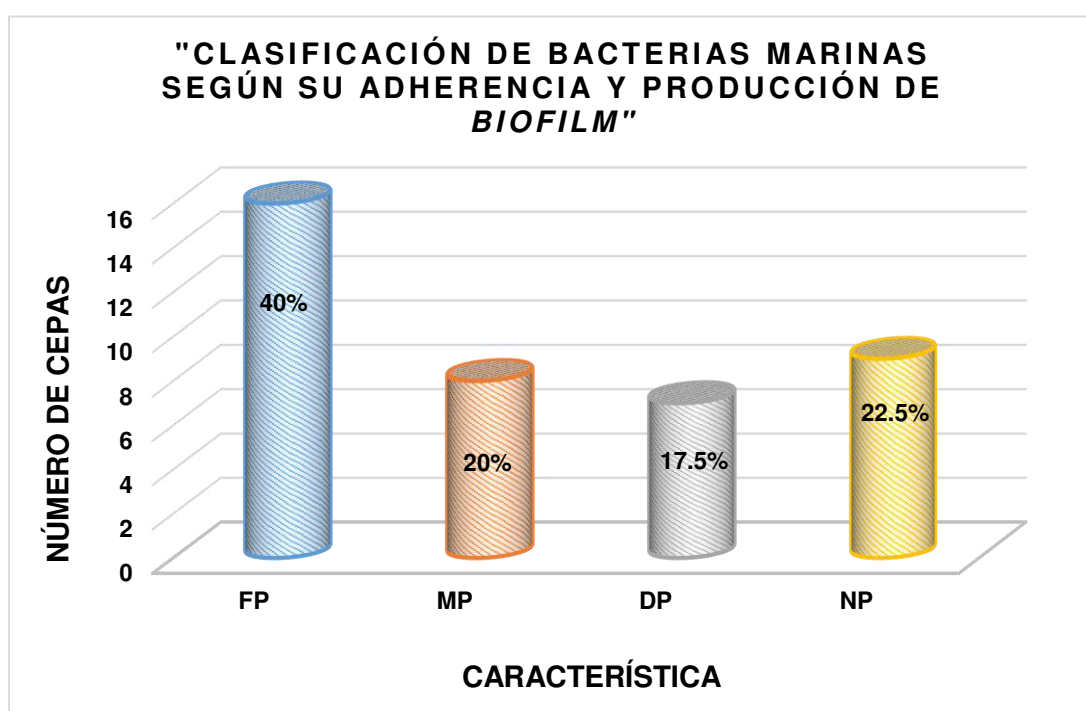
**Figura 16.** Valores de adherencia de las bacterias marinas clasificadas como débilmente productoras de *biofilm*. Se muestran las barras de desviación estándar para cada valor de adherencia.

La **Figura 17** muestra las barras de adherencia construidas con los valores obtenidos a partir de las lecturas del espectrofotómetro de las bacterias marinas clasificadas como no productoras de *biofilm*. De todas las cepas clasificadas en este grupo el valor máximo de adherencia fue producido por la cepa MS5 (ADH=0.135) y el valor mínimo por la cepa M9 (ADH=0.015).



**Figura 17.** Valores de adherencia de las bacterias marinas clasificaron como no productoras de *biofilm*. Se muestran las barras de desviación estándar para cada valor de adherencia.

La **Figura 18** muestra la clasificación de las bacterias marinas clasificadas en cuatro grupos diferentes según su adherencia y producción de *biofilm*. Asimismo muestra el porcentaje de cada grupo según la cantidad de cepas que lo conforman, observándose así que la mayor cantidad de cepas se clasificó como fuertemente productoras de *biofilm*, representando el 40% del total, seguido por las no productoras de *biofilm* con un 22.5% y moderadamente productoras de *biofilm* con un 20%. Finalmente la menor cantidad de cepas se clasificó como débilmente productoras de *biofilm* representando el 17.5% restante.



**Figura 18.** Clasificación de las bacterias según su adherencia y producción de *biofilm*: fuertemente productoras de *biofilm* (FP), moderadamente productoras de *biofilm* (MP), débilmente productoras de *biofilm* (DP) y no productoras de *biofilm* (NP).

Después de la clasificación de las bacterias marinas en grupos diferentes, según su adherencia y producción de *biofilm*, las pertenecientes a las fuertemente productoras de *biofilm* fueron sometidas a diferentes pruebas que comprenden una Identificación taxonómica, las cuales se basaron principalmente en una identificación fenotípica y una identificación molecular.

### 6.3 Identificación fenotípica

La identificación fenotípica se basó principalmente en determinar las características, culturales, metabólicas y fisiológicas, para ello se utilizó la cepa de *V. alginolyticus* como control positivo para ver la variación en el comportamiento de las cepas fuertemente productoras de *biofilm*.

#### 6.3.1 Características culturales

Para determinar las principales características culturales, se utilizaron dos tipos de medio de cultivo sólido: Agar SWT (**Figura 19 - 20 y Tabla 7**) y Agar TCBS (**Figura 21 - 22 y Tabla 8**).

En la **Figura 18** se muestra el crecimiento (colonias) de la cepa M28 en agar SWT después de 24 horas de incubación.



**Figura 19.** Crecimiento general de la cepa M28 en agar SWT (24 h).

En la **Figura 20** se observa el crecimiento (colonias) de la cepa M28 en agar SWT después de 24 horas de incubación, asimismo se describe las características culturales de la cepa.

COLONIA DE M28 EN AGAR SWT	CARACTERÍSTICAS	
	MORFOLOGÍA	M28
	Tamaño	2 mm
	Forma	Circular
	Borde	Entera
	Superficie	Lisa
	Elevación	Convexa
	Luz transmitida	Opaca
	Consistencia	Blanda
	Color	Blanca

**Figura 20.** Crecimiento y caracterización cultural de las colonias de la cepa M28, en agar SWT.

En la **Tabla 11**, se representa las principales características culturales de las cepas fuertemente productoras de *biofilm* en agar SWT después de 24 horas de incubación.

**Tabla 7.** Características culturales de las cepas fuertemente productoras de *biofilm* en agar SWT.

CARACTERÍSTICAS CULTURALES DE BACTERIAS MARINAS FUERTEMENTE PRODUCTORAS DE <i>BIOFILM</i> EN AGAR SWT								
CEPA	Tamaño	Forma	Borde	Superficie	Elevación	L. T	C	Color
<i>Vibrio a*</i>	6-9 mm	ahusada	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Blanda	Crema
<b>M1</b>	6-8 mm	Circular	Entera	Lisa	Plana	Opaca	Blanda	Crema
<b>M8</b>	2-4 mm	Circular	Entera	Rugosa	Plana	Opaca	Blanda	Crema
<b>M15</b>	3-5 mm	Circular	Entera	Lisa	Umbonada	Traslúcida	Blanda	Crema
<b>M17</b>	2-4 mm	Circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Blanda	Crema
<b>M24</b>	5-7 mm	Circular	Entera	Lisa	Plana	Opaca	Blanda	Crema
<b>M25</b>	2-4 mm	Circular	Entera	Lisa	Plana	Traslúcida	Blanda	Crema
<b>M28</b>	2-3 mm	Circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Blanda	Blanca
<b>M30</b>	5-7 mm	Circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Blanda	Crema
<b>M32</b>	7-9 mm	Circular	Entera	Lisa	Plana	Transparente	Blanda	Blanca
<b>CG5</b>	3-4 mm	Circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Blanda	Beige
<b>CS39</b>	7-9 mm	Ahusada	Entera	Rugosa	Plana	Opaca	Blanda	Crema
<b>CS5</b>	4-6 mm	Circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Blanda	Beige
<b>MX51</b>	5-7 mm	Circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Blanda	Crema
<b>MP7</b>	9- + mm	Ahusada	Aserrada	Rugosa	Plana	Opaca	Blanda	Beige
<b>MT7</b>	4-7 mm	Ahusada	Entera	Rugosa	Plana	Opaca	Blanda	Crema
<b>MT8</b>	ND	Crema	ND	Lisa	Plana	Opaco	Blanda	Crema

*Vibrio a\**: *Vibrio alginolyticus*; cepa de referencia. (ND): No definida. (LT): Luz transmitida. (C): Consistencia

En la **Figura 21** se muestra el crecimiento de la cepa M28 en agar TCBS después de 24 horas de incubación.

### M28 EN AGAR TCBS



**Figura 21.** Crecimiento general de la cepa M28 en agar TCBS (24 h).

En la **Figura 22** se muestra el crecimiento de la cepa M28 en agar TCBS después de 24 horas de incubación, asimismo se describe sus características culturales.

### COLONIA DE M28 EN AGAR SWT

### CARACTERÍSTICAS



#### MORFOLOGÍA

#### M28

<b>Tamaño</b>	4 mm
<b>Forma</b>	Circular
<b>Borde</b>	Ondulada
<b>Superficie</b>	Lisa
<b>Elevación</b>	Convexa
<b>Luz transmitida</b>	Opaca
<b>Consistencia</b>	Mucoide
<b>Sacarosa</b>	Positivo

Colonias amarillas por la fermentación de la sacarosa

**Figura 22.** Crecimiento y caracterización cultural de las colonias de la cepa M28, en agar TCBS.



En la **Tabla 8** se representa las principales características culturales de las cepas marinas fuertemente productoras de *biofilm* en agar TCBS después de 24 horas de incubación.

**Tabla 8.** Características culturales de cepas fuertemente productoras de *biofilm* en agar TCBS.

CARACTERÍSTICAS CULTURALES DE BACTERIAS MARINAS FUERTEMENTE PRODUCTORAS DE <i>BIOFILM</i> EN AGAR TCBS								
CEPA	Tamaño	Forma	Borde	Superficie	Elevación	L. T	C	S
<i>Vibrio a*</i>	7-8 mm	Circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Mucoide	+
<b>M1</b>	3-5 mm	circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaco	Mucoide	+
<b>M8</b>	2-4 mm	circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Blanda	+
<b>M15</b>	2-4 mm	circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Mucoide	+
<b>M17</b>	3-5 mm	circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Mucoide	+
<b>M24</b>	3-5 mm	circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Mucoide	+
<b>M25</b>	2-4 mm	circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Mucoide	+
<b>M28</b>	7-8 mm	circular	Ondulada	Lisa	Convexa	Opaca	Mucoide	+
<b>M30</b>	3-5 mm	circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Mucoide	+
<b>M32</b>	4-6 mm	circular	Entera	Lisa	Umbonada	Opaca	Mucoide	+
<b>CG5</b>	2-4 mm	circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Mucoide	-
<b>CS39</b>	3-5 mm	circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Mucoide	+
<b>CS5</b>	3-5 mm	circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Blanda	+
<b>MX51</b>	3-5 mm	circular	Ondulada	Lisa	Convexa	Opaca	Mucoide	+
<b>MP7</b>	3-5 mm	circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Mucoide	+
<b>MT7</b>	3-5 mm	circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Mucoide	+
<b>MT8</b>	2-4 mm	circular	Entera	Lisa	Convexa	Opaca	Mucoide	+

*Vibrio a\**: *Vibrio alginolyticus*; cepa de referencia. (L.T): Luz transmitida. (C): Consistencia. (S): Sacarosa. (+): Degrada sacarosa. (-): No degrada sacarosa.

Después de la caracterización cultural, las cepas fuertemente productoras de *biofilm* fueron sometidas a una identificación bioquímica primaria y secundaria.

### 6.3.2 Pruebas bioquímicas

En la **Tabla 9** se muestra los resultados de las pruebas bioquímicas que se realizaron a partir de colonias de las cepas fuertemente productoras de *biofilm* provenientes de agar SWT, estas pruebas fueron: Oxidasa, Catalasa, tinción Gram y Oxidación-Fermentación (OF), así también se muestran los resultados del medio TSI, medio LIA, caldo MR, caldo VP, caldo urea, caldo lisina, caldo ornitina, caldo arginina, medio *Hugh Leifson* con glucosa (aerobio y anaerobio), medio SIM y medio Citrato (ver imágenes en anexo).

**Tabla 9.** Resultado de las pruebas bioquímicas de bacterias fuertemente productoras de *biofilm*.

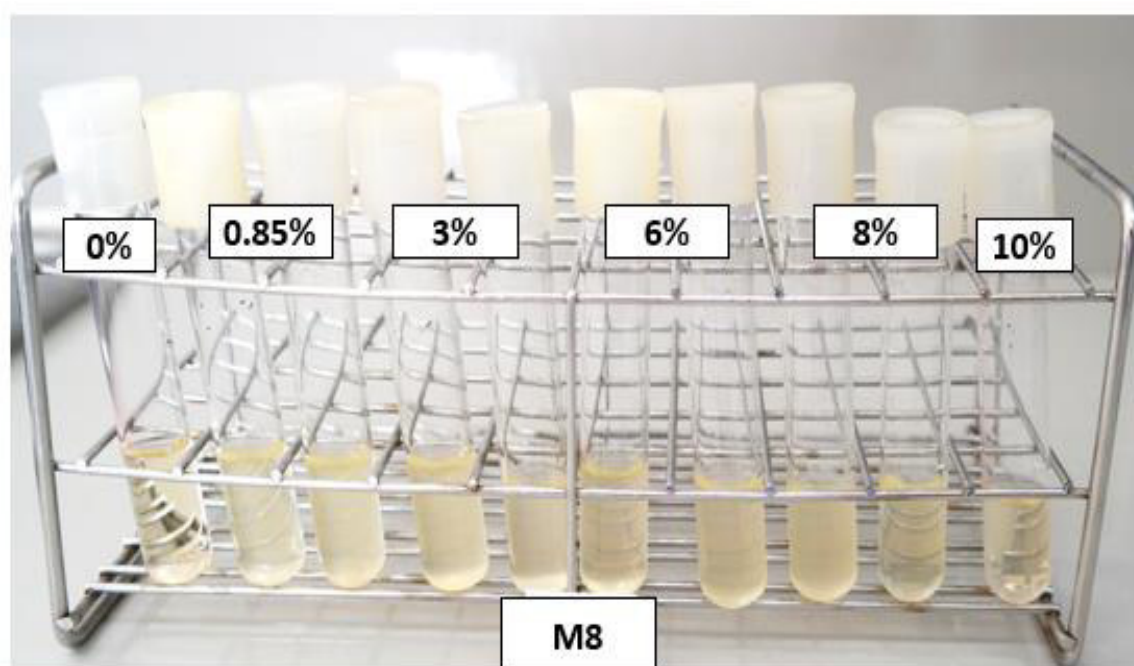
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE BACTERIAS FUERTEMENTE PRODUCTORAS DE <i>BIOFILM</i>																		
PRUEBAS	M1	M8	M15	M17	M24	M25	M28	M30	M32	CG5	CS39	CS5	MX51	MP7	MT7	MT8	<i>Vibrio</i> a.*	<i>Vibrio</i> p.*
Tinción Gram	B -	B -	B -	B -	B -	B -	B -	B -	B -	B -	B -	B -	B -	B -	B -	B -	B -	B -
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Hugh &amp; Leifson</i>	Glu.	Con O <sub>2</sub>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
		Sin O <sub>2</sub>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
	Sac.	Con O <sub>2</sub>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+, g+	+	+	+	-
		Sin O <sub>2</sub>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
	Lac.	Con O <sub>2</sub>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
		Sin O <sub>2</sub>	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
		Crec.	K/K	K/K	A/A	A/A	A/A	K/A	K/A	A/A	A/A	K/A	K/A	A/A	K/A	A/A	A/A	K/A
Medio TSI		H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		Gas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LIA			+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
VP-MR			+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+
UREA			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina/Ornitina/Arginina			+/-/-	-/+/-	+/+/-	+/+/-	-/-/-	-/+/-	-/+/-	-/-/-	+/+/-	+/+/-	-/+/-	-/+/-	-/+/-	-/+/-	+/+/-	+/+/-
SIM		H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		Indol	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
		Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato			-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+

*Vibrio a*: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio p*: *Vibrio parahaemolyticus*, B: Bacteria en forma de bacilo, +: Degradación positiva, -: Degradación negativa, g+: Producción de gas. A: acidez, K: alcalinidad.

### 6.3.3 Prueba de tolerancia a la sal (Cloruro de Sodio NaCl)

La identificación fenotípica de las bacterias marinas se complementó con el estudio de halotolerancia, la cual sirvió también para descartar posibles bacterias contaminantes del ambiente. En la **Figura 23** y **Tabla 10** se observan los resultados de las cepas fuertemente productoras de *biofilm*.

En la **Figura 23** Se muestra el crecimiento (por duplicado) de la cepa M8 a diferentes concentraciones de NaCl. Se observó un crecimiento abundante en las concentraciones de 0.85% a 8% de NaCl, sin embargo en la concentración 10% de NaCl el crecimiento es moderado. Finalmente mencionar que no hubo crecimiento en la concentración de 0% de NaCl.



Crecimiento: (+++): abundante, (++) : moderado, (+): escaso, (-): no creció

**Figura 23.** Crecimiento de la cepa M8 en caldo peptona (por duplicado) con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl).

En la **Tabla 10** Se representan los valores de la tolerancia a la sal (cloruro de sodio, NaCl), donde se observó que la mayoría de las cepas fuertemente productoras de *biofilm* lograron tolerar hasta un 8% de cloruro de sodio, a excepción de las cepas M15 y MP7 que solo toleraron hasta 6% de NaCl, sin embargo las cepas M8, M30, M32, CS39, CS5 y MX51 logran tolerar hasta un 10% de NaCl.

**Tabla 10.** Bacterias fuertemente productoras de *biofilm* en diferentes concentraciones de NaCl.

<b>TOLERANCIA EN NaCl</b>						
<b>CEPA</b>	<b>0%</b>	<b>0.85%</b>	<b>3%</b>	<b>6%</b>	<b>8%</b>	<b>10%</b>
<b><i>Vibrio a*</i></b>	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+)
<b>M1</b>	(-)	(+)	(+++)	(++)	(+)	(-)
<b>M8</b>	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+)
<b>M15</b>	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(-)	(-)
<b>M17</b>	(-)	(++)	(+++)	(++)	(+)	(-)
<b>M24</b>	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(-)
<b>M25</b>	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(-)
<b>M28</b>	(-)	(+)	(+++)	(+++)	(+)	(-)
<b>M30</b>	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+)
<b>M32</b>	(-)	(+)	(+++)	(+++)	(++)	(+)
<b>CG5</b>	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(+)	(-)
<b>CS39</b>	(-)	(+)	(+++)	(+++)	(+)	(+)
<b>CS5</b>	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+)
<b>MX51</b>	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+)
<b>MP7</b>	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(-)	(-)
<b>MT7</b>	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(+)	(-)
<b>MT8</b>	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(-)

*Vibrio a\**: *Vibrio alginolyticus*; Crecimiento: (+++): abundante, (++) : moderado, (+): escaso, (-): no creció

Con los resultados obtenidos en las pruebas de identificación fenotípica se pudo sintetizar las características de cada cepa y se comparó con las características de las cepas de referencia del Manual de Bergey, evidenciando así que la mayoría de las bacterias fuertemente productoras de *biofilm* están altamente asociadas con especies del género *Vibrio*, sin embargo esta identificación no posee el 100% de similitud con las cepas de referencia del Manual de Bergey. Asimismo se observa que existe una mayor diversidad de especies de *Vibrio* en la temporada primavera.

## 6.4 Identificación molecular

### 6.4.1 Cuantificación de ADN

Después de realizar la extracción del ADN se procedió a cuantificarlas mediante espectrofotometría (**Tabla 11**), utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific™). Las concentraciones de ADN obtenidas estuvieron dentro del rango de 32.7 a 147.4 ng/μL. La medición se realizó utilizando 2 μL de las muestras y para blanquear (calibrar) el equipo se utilizó 2 μL de buffer AE. Para cada muestra de ADN extraído se realizó mediciones por triplicado y se obtuvo un promedio final, los cuales se compararon con los valores de referencia del Banco Nacional de ADN Carlos III (España).

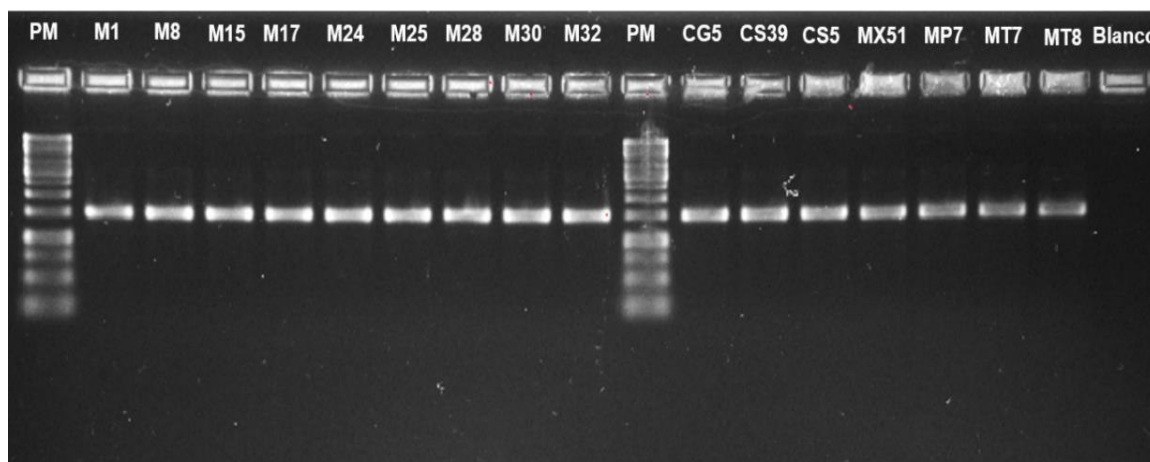
Todos los valores de las muestras de ADN según ABS 260/280, presentaron pureza aceptable y óptima, al igual que ABS 260/230 con excepción de la cepa CS39 cuyo valor (1.45) fue menor a 1.5 lo que indicaría una posible contaminación.

**Tabla 11.** Cuantificación de ADN extraído de las bacterias marinas fuertemente productoras de *biofilm*.

CEPA	[ADN] [ng/μL]	ABS 260/280	ABS 260/230
M1	71	1.9	1.75
M8	50.9	1.82	1.64
M15	58.1	1.87	1.59
M17	95.6	1.99	1.84
M24	58.5	1.82	1.85
M25	59.2	1.88	1.69
M28	76.5	1.73	1.97
M30	58.8	1.97	1.67
M32	45.6	1.93	1.75
CG5	147.4	1.84	2
CS39	43.6	1.71	1.45
CS5	43.5	1.83	1.91
MX51	37.9	1.76	1.62
MP7	32.7	1.8	1.81
MT7	119.8	1.87	1.79
MT8	54.2	1.86	1.76

### 6.4.2 Electroforesis

En la **Figura 24** se muestra los productos de PCR sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, en la cual se visualiza la calidad de las muestras de ADN extraídas de las cepas fuertemente productoras de *biofilm*.



**Figura 24.** Electroforesis de ADN extraído de bacterias marinas fuertemente productoras de *biofilm*. Bandas intensas muestran la presencia de ADN de dichas bacterias. Ladder de 1 Kb. Gel de agarosa al 1.5 %.

### 6.4.3 Identificación molecular

De los resultados obtenidos de MACROGEN, se observó que los cebadores 16Sf y 16Sr amplificaron fragmentos pequeños para las 16 muestras analizadas. Todas las secuencias fueron editadas y sometidas a un análisis usando el programa de la base de datos GenBank. En el resultado de este análisis se encontró que las secuencias de 15 cepas fuertemente productoras de *biofilm*, tienen altos porcentajes de similitud con especies del género *Vibrio*, principalmente con especies de *V. alginolyticus* y *V. natriengens*, en tanto que la cepa M28 fue identificada como *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (**Tabla 12**).

**Tabla 12.** Resultados de la identificación molecular de las cepas fuertemente productoras de *biofilm*.

CEPAS	PORCENTAJE DE SIMILITUD CON CEPAS DEL GENBANK
M1	<i>Vibrio</i> sp. (99%)
M8	<i>Vibrio</i> sp. (99%)
M15	<i>Vibrio alginolyticus</i> (99%)
M17	<i>Vibrio alginolyticus</i> (100%)
M24	<i>Vibrio alginolyticus</i> (100%)
M25	<i>Vibrio alginolyticus</i> / <i>V. natriengens</i> (99%)
M28	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (100%)
M30	<i>Vibrio alginolyticus</i> (100%)
M32	<i>Vibrio alginolyticus</i> / <i>V. natriengens</i> (100%)
CG5	<i>Vibrio</i> sp. (99%)
CS39	<i>Vibrio alginolyticus</i> / <i>V. natriengens</i> (99%)
CS5	<i>Vibrio alginolyticus</i> (100%)
MX51	<i>Vibrio alginolyticus</i> (99%)
MP7	<i>Vibrio</i> sp. (99%)
MT7	<i>Vibrio</i> sp. (99%)
MT8	<i>Vibrio</i> sp. (100%)

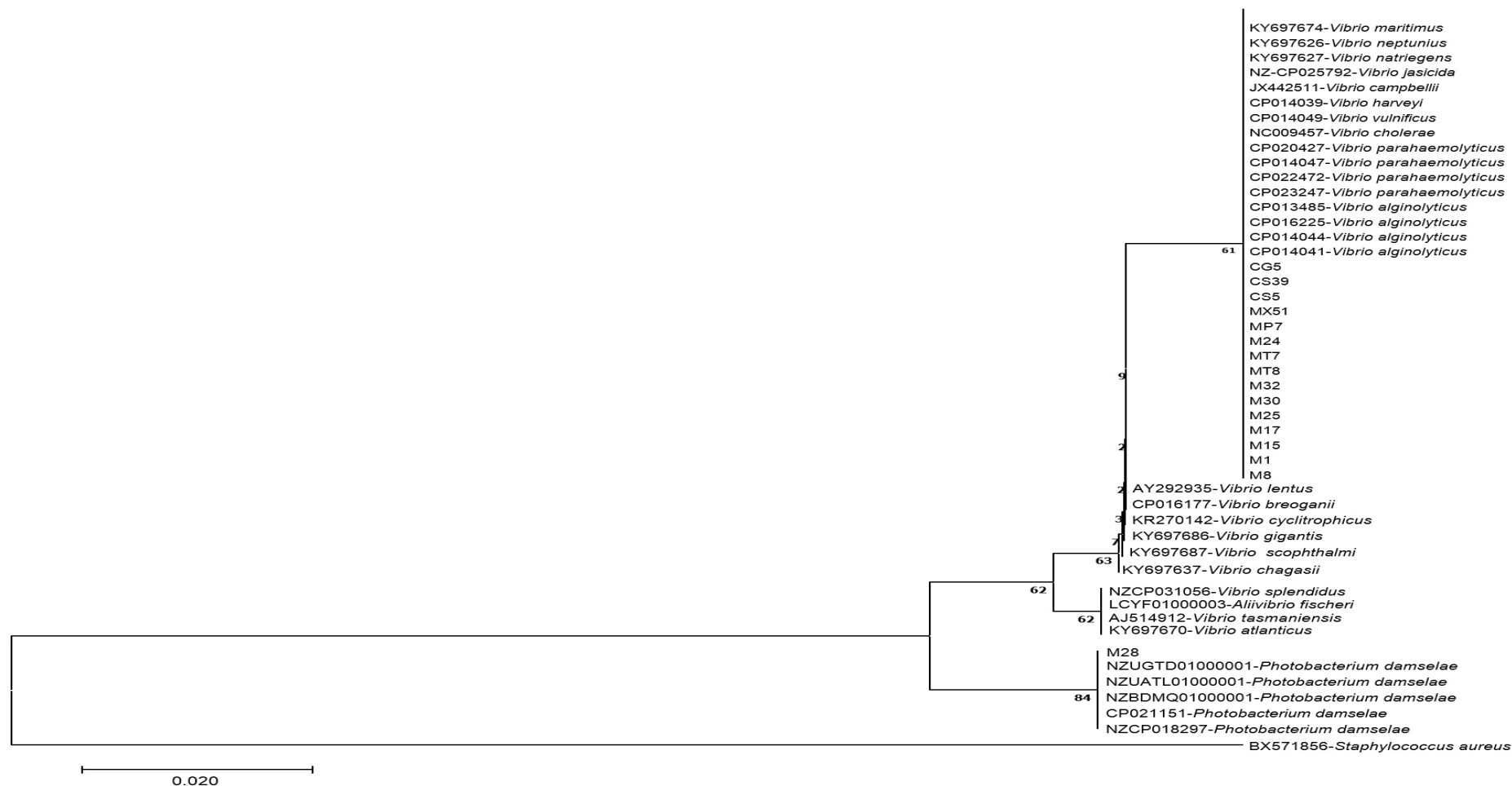
De la tabla anterior se puede evidenciar que no todas las cepas de bacterias fuertemente productoras de *biofilm* fueron identificadas al 100%

#### 6.4.4 Análisis filogenético

Para el estudio filogenético de la región ADNr 16S y en la construcción del árbol filogenético se incluyeron secuencias de las 16 bacterias fuertemente productoras de *biofilm*, secuencias del género *Vibrio*, secuencias de géneros de *Photobacterium damsela* y como grupo externo se utilizó la secuencia de *Staphylococcus aureus*, obtenidas de la base de datos de NCBI. El árbol filogenético se construyó utilizando el método *Neighbor-Joining* (NJ) y el programa Mega 7.0.

En **La figura 25** se muestra el árbol filogenético de las bacterias fuertemente productoras de *biofilm* construidas con el método de *Neighbor-Joining* (NJ), donde se observa que 15 de las cepas asociadas al género *V. alginolyticus* se agrupan en el grupo de esta misma especie y la cepa M28 en el grupo de *Photobacterium damsela*.





**Figura 25.** Árbol filogenético construido con el método *Neighbor-Joining* basado en las distancias genéticas de las secuencias de la región ADNr 16S de los cultivos puros de las bacterias fuertemente productoras de *biofilm* (M1, M8, M15, M17, M24, M25, M28, M30, M32, CG5, CS39, CS5, MX51, MP7, MT7 y MT8), con 1000 repeticiones. El árbol se construyó usando la secuencia de *Staphylococcus aureus* como grupo externo.

## VII. DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que existe gran cantidad y variedad de bacterias marinas fuertemente productoras de *biofilm* en cultivos de *A. purpuratus* (concha de abanico), tras una identificación fenotípica y molecular demostraron ser principalmente bacterias del género *Vibrio*, cuya especie predominante fue *V. alginolyticus*; asimismo se encontró una cepa perteneciente a *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.

### 7.1 Aislamiento de bacterias productoras de *biofilm* adheridas en mallas del cultivo de “concha de abanico” (*Argopecten purpuratus*).

De las 40 cepas de bacterias marinas aisladas del cultivo de “concha de abanico” (*A. purpuratus*) en ambas temporadas, 87,5% de ellas fueron Gram (-) y solo el 12,5% Gram (+). Estos resultados son similares a los presentados por Rheinheimer (1987), quien realizó estudios sobre la diversidad de microorganismos presentes en el agua y reportó que el porcentaje de bacterias Gram (-) presentes en el agua fueron mayor al 90% en comparación a las Gram (+). Asimismo, Mancilla (2003), aisló bacterias a partir de agua y sedimentos marinos de la costa de Valdivia en Chile y cuyo porcentaje de bacterias Gram (-) fueron elevadas (88,7 %), contrariamente a los Gram (+) en un porcentaje mucho menor (5,6 %), por lo expuesto y en concordancia con nuestros resultados. Así también Espinoza (2010), aisló bacterias presentes en cultivos de larvas de *A. purpuratus*, cuya predominancia fue de los Gram (-), representando el 60% respecto a los Gram (+).

Es importante mencionar que actualmente se estima que no más del 1% de bacterias presentes en el agua son cultivables, esta falta de eficacia en el instante de aislar bacterias marinas estaría asociado a que los medios de cultivo que existen en el mercado son extremadamente artificiales cuyas concentraciones de sus componentes son muy diferentes a las concentraciones del ambiente marino (Zengler *et al.*, 2002), no obstante si a un medio de cultivo se le adecua agregando los componentes adecuados de su hábitat, estos pueden convertirse en cultivables (Kaeberlein *et al.*, 2002), Por tal motivo Hongyue (2000), sostiene

que existe poco progreso en la colección de cepas bacterianas aisladas en las primeras etapas de la formación del *biofouling*. Sin embargo existen estudios que demuestran que con la adición de algunos compuestos orgánicos, se pueden mejorar grandemente la eficiencia en el proceso de aislamiento de bacterias marinas, tal es el caso de Joint *et al.* (2010), quienes añadieron cloruro de amonio al agar base y ello condujo a una mayor proporción de bacterias aisladas.

## **7.2 Evaluación de bacterias marinas según su producción de *biofilm*, mediante prueba de adherencia**

Los valores obtenidos en la prueba de adherencia fueron analizados utilizando la prueba estadística de desviación estándar, con un valor  $p < 0.05$  y un nivel de significancia del 95%, para conocer la variación en la formación de *biofilm* según los grupos establecidos, con estos valores se clasificó a las cepas en cuatro grupos: no productoras (22.5%), débilmente productoras (17.5%), moderadamente productoras (20%) y fuertemente productoras de *biofilm* (40%), siendo este último el grupo de importancia para este estudio.

Esta la prueba de adherencia también fue utilizada por Martínez (2010), quien evaluó la capacidad de adherencia y producción de *biofilm* de cepas bacterianas Gram (-) provenientes de los *biofilms* de organismos acuáticos como esponjas y bivalvos de la bahía de Santa Martha (Colombia). Los valores de absorbancia (621 nm) de las cepas más productoras de *biofilm* estuvieron en el rango de 1.4 - 1.8 O.D, estos valores se encuentran dentro del rango obtenido en este estudio, cuyos valores fueron desde 0.97-4.874 O.D.

Por su parte, Gómez *et al.*, (2013), realizaron un estudio sobre la formación de *biofilm* de 153 cepas de bacterias Gram (-), a la vez cuantificaron la producción de *biofilm* mediante un análisis de densidad óptica (575 nm), el cual, al igual que en este estudio les permitió clasificar las cepas en cuatro grupos: formadores fuertes, moderados, débiles y no formadores de *biofilm*. Los resultados arrojaron que el 35.25% de estas cepas fueron capaces de producir *biofilm* (fuerte, moderada, y débil) en placas de poliestireno. Este porcentaje de cepas capaces de producir *biofilm* es inferior al obtenido en este estudio

(77.5%), esta diferencia podría estar relacionado con los tipos de medios de cultivos utilizados para inducir la producción de *biofilm*, mientras que en el estudio anterior utilizaron caldo TSB (más nutrientes), en este estudio se utilizó caldo SWT (menos nutrientes). Este comportamiento es explicado por Morado *et al.* (2017), quienes sostienen que la estimulación de formación de *biofilm* y adherencia bacteriana será mayor en condiciones de escasez de nutrientes en el medio en la cual se encuentran.

Estudios anteriores señalan que la formación del *biofilm* marino es esencial en el proceso de formación del *biofouling*, ya que actúa como señal para dar inicio al asentamiento de diversos organismos eucariotas, sobretodo en larvas de invertebrados, especies sésiles colonizadores de sustratos como esponjas y moluscos, entre otros (Callow y Callow, 2002). Por tal motivo se considera a los *biofilms* bacterianos como la causa inicial para la formación del *biofouling* ya que la adhesión bacteriana es una etapa temprana en la formación de sus componentes y que la orientación y deslizamiento de los microorganismos presentes dependen de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) secretadas mediante reacciones bioquímicas Julistiono *et al.*, (2018), Por lo expuesto se pone en evidencia que existe una amplia correlación entre el *biofilm* y el *biofouling*, y que su composición y complejidad están determinadas por su ubicación y distribución geográfica Callow y Callow (2002), estos datos son de suma importancia puesto que las condiciones geográficas donde se realizó este estudio posee condiciones ambientales que favorecen un mayor desarrollo de micro y macrorganismos.

Por otro lado, Pacheco y Garate (2005) realizaron estudios sobre *biofouling* en estructuras del cultivo de *A. purpuratus* en la bahía de Samanco donde encontraron diversos organismos eucariontes colonizando dichas estructuras, entre ellos organismos que han sido reportados como causantes principales de mortalidades en este moluscos, llegando a la conclusión que el desarrollo de estos y demás eucariontes se ven favorecidos con los exopolisacáridos del *biofilm* producidos por los organismos del asentamiento inicial, ya que les sirve como alimento, con esta conclusión se puede deducir que las bacterias de este

estudio podrían estar asociadas en la mortalidad, de *A. purpuratus*, puesto que se ha demostrado que son bacterias que producen grandes cantidades de *biofilm*.

La formación de *biofilm* sobre superficies, actualmente se considera como un problema de salud pública emergente en todo el mundo, ya que su presencia se ha asociado con brotes de enfermedades, así como un problema en las industrias alimentarias Srey *et al.*, (2013).

Por otro lado la participación de bacterias que no fueron capaces de producir cantidades de *biofilms* necesarios para ser considerados como cepas fuertemente productoras, no deben ser menospreciados ya que cumplen un papel importante en el desarrollo del *biofouling*, ya que investigaciones recientes mostraron que en el medio marino existen interacciones sinérgicas entre todos los miembros que lo habitan (bacterias formadoras y no formadoras de *biofilms*, colonizadores posteriores y los factores abióticos), aunque los mecanismo de acción utilizados aun no son muy conocidos Von Ammon *et al.*, (2018), por lo tanto el 60% de bacterias aisladas estarían cumpliendo también un rol muy importante en el proceso de adherencia y producción de *biofilm* de las cepas fuertemente productoras.

A este nivel es importante resaltar que los valores de adherencia obtenidos en esta investigación son fáciles de obtener, interpretar y comparar con otros estudios de adherencia, por lo expuesto se considera que este método sobre la evaluación de adherencia y producción de *biofilm*, es una herramienta útil para este tipo de estudios, ya que brinda resultados confiables; rápidos, porque es de fácil realización, asimismo los materiales utilizados son de bajos costos, convirtiéndose así en un método aún más atractivo.

### **7.3 Identificación fenotípica de bacterias fuertemente productoras de *biofilm***

Las 16 cepas clasificadas dentro del grupo “fuertemente productoras de *biofilm*” fueron seleccionadas para la identificación fenotípica, donde 15 de ellas pertenecieron al género *Vibrio*, representando el 93.75% del total de las cepas aisladas. Esta superioridad en el

aislamiento del género *Vibrio* en muestras marinas, también fue obtenido por Mancilla (2003), quien reportó que el 54,9% del total de cepas pertenecieron a este género.

Asimismo Nandhini y Revath (2016), aislaron bacterias del *biofilm* presentes en superficies de barcos de pesca en el puerto de Chennai (India) durante seis meses, la identificación lo realizaron siguiendo las claves de las pruebas bioquímicas descritas en el Manual de Bergey, finalmente reportaron diferentes géneros, entre ellos bacterias del género *Vibrio*, presentes en todos los meses de muestreo, siendo estos resultados muy similares a los obtenidos en este estudio.

Los porcentajes de similitud de las pruebas bioquímicas de las 15 cepas del género *Vibrio*, con las especies de referencia del Manual de Bergeys fueron variados, donde 9 cepas presentaron altos porcentajes (90 a 95%) únicamente con *V. alginolyticus* y bajos porcentajes de similitud (inferior al 60%) con otras especies, sin embargo las 6 cepas restantes presentaron porcentajes de similitud entre el 75 a 90% con las siguientes especies; *V. hollisae*, *V. natriegens*, *V. cholerae* y *V. mimicus*. Con estos datos podemos catalogar a *V. alginolyticus* como la principal especie responsables de la formación de *biofilm* en cultivos de “concha de abanico”, estos resultados fueron similar a los obtenidos por Ben Abdallah *et al.* (2009), quienes demostraron que de todas las cepas sometidas a la evaluación de adherencia, solo *V. alginolyticus* fue capaz de producir *biofilm* en placas de poliestireno, contrariamente a *V. parahaemolyticus* cuya cepa fue clasificada como débilmente productora de *biofilm*, resultados que permiten corroborar la buena elección de la cepa como control negativo utilizado para este estudio.

Por otro lado Khandeparker *et al.*, (2014), realizaron estudios de relación entre los *biofilms* de bacterias marinas con diatomeas, para ello aislaron dichos microorganismos a partir de portaobjetos de poliestireno sumergidos durante 4 días en aguas de la bahía de Goa, (La India), la identificación de los aislados bacterianos lo realizaron siguiendo las claves descritas en el Manual de Bergey con los que identificaron especies bacterianas bacterias pertenecientes al género *Vibrio*, siendo; *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y

*Vibrio* spp, con estos resultados señalan también al género *Vibrio* como uno de los grupos principales de la formación del *biofouling* marino.

Estas prevalencias de bacterias del género *Vibrio* en adherencia y producción de *biofilm* sobre superficies sólidas bajo el agua, es explicado por Kogure *et al.*, (1998), quienes realizaron un estudio sobre evaluación de adherencia con cepas de *V. alginolyticus* y cepas mutantes de las misma (sin flagelos), para determinar si la natación (por flagelos) tiene alguna relación con la capacidad de apego sobre superficies sumergidas dentro de un medio acuático. En los resultados encontraron que las cepas de *V. alginolyticus* no mutantes se adherían con mayor rapidez respecto a las otras, concluyendo así que este hecho se debería principalmente a la presencia de flagelos laterales y polares, siendo estas últimas las más importantes, debido a que las células que los poseen presenten una mayor velocidad de motilidad haciendo que se muevan más rápido, lleguen primeras a la superficie sólida y sean las primeras en iniciar el proceso de adherencia dejando en la fase líquida a las bacterias sin flagelo por ser más lentas para colonizar una superficie, además señalan que dicha velocidad está relacionada con la concentración de  $\text{Na}^+$  en el medio. Asimismo O'Toole, *et al.*, (2000), también señalan que los flagelos y los pilis tipo IV, vendrían a ser los principales responsables en promover el apego inicial de las bacterias a una superficie, ya que estas ventajas les confiere ventajas de colonización frente a otras bacterias que no presentan estas estructuras, sin embargo consideran también que no son necesariamente indispensables para eventos postreros, por lo que después de dicha unión podrían perderlos, esto explicaría el motivo por el cual en este estudio todas las cepas identificadas inicialmente como bacterias móviles, perdieron esta capacidad en pruebas posteriores.

Por su parte, Ben Abdallah *et al.*, (2009), señalan que en bacterias de *V. alginolyticus*, además de las estructuras mencionadas, también juegan un rol muy importante la producción de exopolisacáridos compuesto principalmente por limo, cuya importancia radica en que además de causar patologías en infecciones causadas por esta especie, refuerzan la unión de las células bacterianas a superficies, esto explicaría el motivo por el cual el *biofilm*

producido por *V. alginolyticus* no se desintegran fácil como el *biofilm* producido por cepas de *Pseudomonas*, Sin embargo, durante las pruebas experimentales se observó que un gran número de bacterias se desprendían de las superficies en las que se encontraban, este comportamiento responde a que la unión entre una bacteria y una superficie sólida puede ser afectado por diversos factores: fisicoquímicos, biológicos, hidrofóbicos, apéndices de la superficie bacteriana, composición de las sustancias poliméricas extracelulares, estado fisiológico, concentración de electrolitos y velocidad de motilidad.

La importancia de la presencia de algunas especies de *Vibrio*, especialmente *V. alginolyticus* es que son capaces de unirse a diferentes células humanas, principalmente en células epiteliales, intestinales entre otras. Este comportamiento es transcendental ya que la adherencia de estos patógenos a las superficies del huésped es un paso crucial en la patogénesis de casi todas las enfermedades infecciosas Ben Abdallah *et al.*, (2009).

#### **7.4 Identificación molecular de bacterias fuertemente productoras de *biofilm*, utilizando las secuencias del ADNr 16S**

Las secuencias de las cepas fuertemente productoras de *biofilm* utilizando el marcador molecular ADNr 16S, mostraron altos porcentajes de similitud entre dos o más cepas, evidenciando así que hubo poca especificidad en esta identificación, ya que solo permitió identificar a nivel de género, sin embargo una de las cepas se identificó a nivel de especie.

La utilidad y el éxito del marcador molecular ADNr 16S ha sido ampliamente aceptado para realizar estudios de relaciones filogenéticos de diversos organismos porque posee secuencias altamente conservadas (universales) entre los diferentes organismos, así como en secuencias altamente variables (específicas) entre especies y grupos bacterianos (Hernández, 2000), sin embargo en la identificación molecular de este estudio se determinó que solo una de las cepas de bacterias marinas fue identificada en su totalidad a nivel de especie, la cual se reportó como *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, mientras que las 15 restantes solo se identificaron a nivel de género (*Vibrio*), ya que la mayoría presentaron altos porcentajes de similitud.



Inicialmente, se consideraba que una similitud igual o mayor que el 97% entre las secuencias de ADNr 16S indicaba pertenencia a la misma especie, sin embargo un estudio más reciente, apoyado por pruebas estadísticas, reveló que un valor del 98.65% de similitud del gen ADNr 16S puede ser utilizado como umbral para la diferenciación de dos especies, por otro lado valores igual o menor que el 94.5%, 86.5%, 82.0%, 78.5% ó 75.0% establecen la distinción de género, familia, orden, clase y filo, respectivamente (Valenzuela, 2015). Sin embargo, los porcentajes de similitud entre especies de *Vibrio* presentes en este estudio fueron superiores al 98,65%, incluyendo valores del 100%. Así también, Espinoza (2010), reportó e identificó 17 cepas bacterianas, solamente a nivel de géneros, incluyendo *Vibrio* sp. (12% del total) en cultivos de larvas de *A. purpuratus*, mediante la secuenciación parcial del marcador molecular ADNr 16S, cuyos partidores universales utilizados al igual que en esta investigación también fueron ligeramente modificados con el nucleótido artificial Y, estos fueron; 1492r (5' GGYTACCTTGTTACGACTT 3') y 27f (5' AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG). Estos resultados concuerdan con los resultados de este estudio, debido a que no hubo una identificación definitiva y exacta de cepas bacterianas a nivel de especies referentes al género *Vibrio*, este comportamiento es explicado por Olmos (2003), quien sostiene que las secuencias específicas del marcador molecular ADNr 16S no son determinantes para el género *Vibrio* a nivel de especie.

Por este motivo el mismo autor señala que para una correcta identificación se requiere de metodologías más precisas como Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real-time polymerase chain reaction, *Real-time PCR*) e hibridación fluorescente *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridization, *FISH*) ya que las muestras que se analizan en una PCR convencional provienen de cultivos realizados en laboratorios donde ya es sabido que más del 98% bacterias marinas no crecen debido al requerimiento de nutrientes y elementos que necesitan para su desarrollo. Este comportamiento de algunas especies de bacterias marinas pone en evidencia que las identificaciones bacterianas basadas en pruebas moleculares como el PCR convencional, son bastante exactas y útiles, pero que no son conclusivos (Hernández, 2000).

Por su parte Waturangi *et al.*, (2017), reportaron que las cepas de bacterias del *biofouling* presentes en las superficies sumergidas de botes en Indonesia, mostraron capacidad para producir *biofilm*, las cuales luego de ser identificadas mediante PCR utilizando las secuencias del gen ADNr 16S, resultaron ser principalmente bacterias de tres géneros; *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Vibrio*, siendo este último, el género predominante (62.5%), cuyas especies presentes fueron específicamente *V. alginolyticus*, *V. natriegens* y *V. neocaledonicus*, los porcentajes de similitud no alcanzaron el 100 %, sino solamente el 99% de cada una.

Asímismo, Julistiono *et al.*, (2018), utilizando las secuencias del marcador genético ADNr 16S, cuyos primers fueron; 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'), con los resultados obtenidos reportaron la presencia de *V. alginolyticus* (99-100% de similitud) y *V. natriegens* (99-100% de similitud) como las principales responsables de la producción de *biofilms* presentes en superficies de barcos sumergidas en agua de mar de la bahía de Yakarta (Indonesia); sin embargo, la secuencia de nucleótidos del gen ADNr 16S de otras cepas clasificadas también como *V. alginolyticus* y *V. natriegens* fueron ligeramente diferentes en comparación con las primeras, para determinar estas diferencias y similitudes utilizaron secuencias multilocus *recA* y *rpoA*. Finalmente estos resultados fueron plasmados y explicados mediante un árbol filogenético donde se confirmó la relación existente entre dichas cepas y otras especies de *Vibrio*, ya que todas se agruparon en el mismo grupo, junto a otras especies de *Vibrio*, tales como; *V. parahaemolyticus*, *V. diabolicus*, *V. harveyi* y *V. Campbellii*. Estos resultados, concuerdan con los obtenidos en esta investigación ya que también se encontraron que las secuencias de nucleótidos del gen ADNr 16S de cepas pertenecientes al género *Vibrio* son muy similares entre sí, esto vendría a ser explicado por Gómez *et al.*, (2004) quienes señalan que varias especies del género *Vibrio* tienen secuencias de ARNr 16S casi idénticas y características fenotípicas similares, por tal motivo la identificación de bacterias pertenecientes al género *Vibrio* utilizando únicamente secuencias del gen ARNr 16S a nivel de especies vendría a ser muy complicada.

Por lo expuesto en el texto anterior, Thompson *et al.*, (2005), realizaron un estudio de las *secuencias* de *genes rpoA*, *recA* y *pyrH* para la identificación de 192 cepas de *Vibrio*, los resultados que obtuvieron de los tres locis genéticos fueron más discriminatorios entre especies que las secuencias de ARNr 16S, por lo que queda claro que para la identificación de especies de *Vibrio* se recomienda realizar un análisis de secuencias multilocus

De las cepas identificadas en el presente trabajo de investigación se resalta la preponderancia del genero *Vibrio*, esto podría estar relacionado con lo planteado por Espinoza *et al.*, (2011), quienes señalan que la microbiota presente al inicio de un cultivo de “concha de abanico” es desplazado a medida que pasa el tiempo por bacterias del genero *Vibrio*, las cuales finalmente terminan por dominar y desplazar a los demás microorganismos.

El dominio de *V. alginolyticus* y *Vibrio* sp. en este estudio sobre el cultivo de concha de abanico y cultivos marinos en general podrían estar relacionados con la actividad antagónica que poseen, ya que según Sotomayor y Balcázar (2003), inhiben hasta el 50% la presencia de otros géneros bacterianos, incluyendo especies del mismo género.

Uno de los aspectos más importantes de la presencia de *V. alginolyticus* en cultivos de concha de abanico, radica en que son las principales responsables de causar severas enfermedades en la caparazón de crustáceos, causar septicemias y afectar los primeros estadios larvarios de camarones y moluscos bivalvos (Olmos, 2003), asimismo se conoce que estas bacterias son las principales causantes de una alta tasa de mortalidad en etapas tempranas del desarrollo larval de concha de abanico (Riquelme *et al.*, 1995) y que en casos de vibriosis conlleva a la muerte debido a un estado de estrés del hospedero Platt *et al.*, (1995).

Además, de la gran dominancia del género *Vibrio* identificado en este estudio, se identificó a una cepa como *P. damsela* subs. *damsela* con 100% de similitud, siendo la primera vez que se reporta la presencia de esta bacteria en cultivos de “concha de abanico” y cuya importancia radica básicamente en que son causantes de infecciones en humanos que

están asociadas generalmente a la ingestión de moluscos contaminados, cuyas manifestaciones clínicas más frecuentes en los pacientes son: gastroenteritis, infecciones a la piel, septicemia y en algunos casos llevar a la muerte del paciente, este último en pacientes inmunocomprometidos o con bajas defensas Rowe-Magnus *et al.*, (2006).

### **7.5 Comparación entre la cantidad y diversidad de bacterias fuertemente productoras de *biofilm* en la temporada verano y temporada primavera**

A la fecha, en Perú, no existen estudios comparativos que se hayan realizados en las temporadas de verano y primavera, ni otras temporadas específicas que sirvan para evaluar la cantidad y diversidad de bacterias productoras de *biofilm* con capacidad de adherencia y responsables de la formación del *biofouling*, por ello, este estudio vendría a ser el primero en su categoría.

Los resultados obtenidos en este estudio arrojaron que hubo mayor cantidad de cepas de bacterias marinas fuertemente productoras de *biofilm* aisladas en la temporada verano (9) y una menor cantidad en primavera (7), esta diferencia podría estar relacionado con la variación de factores como nutrientes, oxígeno disuelto, luz, concentración de sal y la temperatura, siendo este último el que posee efectos más fuertes que los factores antes mencionados (Sunagawa *et al.*, 2015).

Asimismo, Staroscik y Smith (2004), realizaron estudios sobre la abundancia de microorganismos en aguas de las islas de Fox, Estados Unidos. En sus resultados señalan que la producción y abundancia de bacterias presentes en el mar varían de manera significativa con la temperatura del agua, cuyo punto máximo alcanzan cuando las temperaturas son  $> 18^{\circ}\text{C}$ , y alcanzan su nivel más bajo en temperaturas más frías (septiembre hasta enero). Asimismo, señalan que la abundancia podría aumentar hasta 5 veces desde el invierno hasta el verano. Por tal motivo, se esperaba que las bacterias presentes en el *biofilm* de verano reflejará una mayor abundancia que en primavera, sin embargo como señalan los mismos autores es posible que los *biofilms* de invierno pueden producir una mayor biomasa que en otras temporadas, debido a que las poblaciones

bacterianas presentes en el *biofilm* tienden a ser más activas en condiciones de invierno, siempre que haya nutrientes y carbono disponibles, alentando el crecimiento.

Por otro lado, se encontró que la diversidad de bacterias marinas fuertemente productoras de *biofilm* fue ligeramente más en primavera que verano (diferenciándose principalmente a nivel de especies), resultados similares fue obtenido por Killea (2014), quien sostiene que en primavera a pesar de las bajas temperaturas del agua, la disponibilidad de nutrientes y el aumento de los niveles de luz favorecen el crecimiento de diversos organismos del *biofilm*, debido a que en esta temporada del año existe una mayor abundancia de materia orgánica e inorgánica que podrían ser utilizados por una mayor diversidad de microorganismos.

Además, Ladau *et al.*, (2013), explican que la diversidad y riqueza bacteriana es alta en temperaturas que abarcan desde 4 hasta 12 °C, contrariamente a temperaturas que van desde los 12 hasta los 30 °C, por consiguiente la mayor diversidad y riqueza de bacterias marinas se encuentra en invierno y en menor proporción en verano, por su parte en primavera y otoño presentan diversidad intermedia, esto sugiere una predominancia de diversidad y riqueza bacteriana en estas temporadas frente a la temporada de verano, coincidiendo así con los resultados obtenidos en este estudio. Además, Uribe *et al.*, (2001), señalan que la predominancia existente en esta temporada también podría estar relacionada con la mayor disponibilidad de alimento en el mar, y no solamente a las condiciones ambientales que se consideraba antiguamente.

Loayza (2014), comparó el *biofouling* producido en verano e invierno, reportando que la mayor producción de *biofouling* se encontró en invierno con un 31% de especies más que en verano, el cual estaría asociada a una mayor concentración de oxígeno disuelto en el medio, contrariamente a lo que sucede en verano; estos resultado son similares a los nuestros. Así mismo es importante mencionar que los resultados de este estudio podrían estar asociados directamente a la formación y producción de *biofilm*, ya que a mayor cantidad de *biofilm*, podría haber un mayor desarrollo de *biofouling* y viceversa.

En definitiva habiendo identificado los principales géneros de bacterias implicadas en el asentamiento del *biofouling* y conociendo sus mecanismos de adhesión al sustrato y producción de *biofilm*, este trabajo de investigación puede servir de base para desarrollar nuevos métodos de control que interfieran con los mecanismos que desarrollan algunos géneros bacterianos en el proceso de adhesión, métodos basados especialmente en compuestos naturales, debido a que en el mercado se encuentran principalmente compuestos químicos, cuyo uso están siendo prohibidas por las normativas ambientales debido a que son tóxicos para diversos organismos marinos Callow y Callow (2002).

Actualmente en la bahía de Huaynuma y en otras zonas de cultivo de *A. purpuratus* la medida más utilizada para disminuir la formación de *biofouling* sobre las linternas de cultivo, es ubicarlas a profundidades de 5-7 m; sin embargo, a este nivel se enfrenta a otros problemas debido a la disminución de las concentraciones de oxígeno disuelto, el cual es uno de los principales factores, por tal motivo se recalca y se confirma que existe la necesidad e importancia de identificar las bacterias en cuestión.

## VIII. CONCLUSIONES

- Las bacterias aisladas del cultivo de concha de abanico fueron principalmente bacterias Gram negativas, en forma de bacilo, además se aislaron bacterias Gram positivas y en formas de coco.
- La prueba de adherencia utilizada permitió evaluar y clasificar las bacterias aisladas según su producción de *biofilm*, de las 40 bacterias sometidas a esta prueba; 16, 8 y 7 demostraron ser fuerte (40%), moderada (20%) y débilmente (17,5%) productoras de *biofilm*, respectivamente. Así mismo 9 (22,5%) de ellas no fueron capaces de producir *biofilm*.
- La identificación fenotípica y molecular mostraron que el género más frecuente en cepas de bacterias fuertemente productoras de *biofilm* fue *Vibrio*, principalmente la especie de *Vibrio alginolyticus*.
- La cepa M28 fue identificada al 100% como *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, cuya importancia radica en ser el primer reporte de esta especie en cultivos de *A. purpuratus* de la bahía de Huaynuma (Casma - Perú).
- La mayor cantidad de bacterias fuertemente productoras de *biofilm* se encontró en la temporada de verano y en la temporada de primavera hubo una mayor diversidad (más especies bacterianas).

## IX. RECOMENDACIONES

- Simular los parámetros fisicoquímicos de la zona del aislamiento para propiciar condiciones naturales muy similares y poder aislar el mayor número de cepas posibles.
- Optar por métodos de identificación más rápidos y seguros, ya que los métodos tradicionales requieren de tiempos prolongados en cuyos procesos se pierden grandes porcentajes de especies en cuestión.
- Emplear métodos moleculares de identificación complementarios, los cuales podrían ser; PCR en tiempo Real, Hibridación In-Situ Fluorescente (FISH).
- Repetir el estudio en las diferentes estaciones del año, para verificar la variabilidad de la producción de *biofilm* y la adherencia bacteriana en las linternas del cultivo, respecto a las reportadas en las estaciones de verano y primavera.



## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, A. Influencia de la calidad nutricional del *neuston* sobre el crecimiento, condición reproductiva y composición química de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*), Lamarck 1819. Asesor: Jaime Mendo. Tesis para optar al grado de ingeniero pesquero. UNALM, Facultad de Pesquería, Lima, 2009.
- ANTUNES, F., HINZMANN, M., LOPES-LIMA, M., MACHADO, J., MARTINS DA COSTA P., 2010. Association Between Environmental Microbiota and Indigenous Bacteria Found in Hemolymph, Extrapallial Fluid and Mucus of *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758). *Microbial Ecology*, vol. 60, no. 2, pp. 304-309.
- BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III. Programa control de calidad de muestras. Universidad de Salamanca. España. [En línea] [Fecha de consulta: 25 de enero 2017]. Disponible en: <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>
- BEAZ-HIDALGO, R., BALBOA, S., ROMALDE, J., FIGUERAS, M., 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environ Microbiol Rep*, vol. 2, no. 1, pp. 34-43.
- BEN ABDALLAH, F., CHAIEB, K., ZMANTAR, T., KALLEL, H., y BAKHROUF, A., 2009. Adherence assays and Slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. Brazilian journal of microbiology. *Brazilian Journal of Microbiolog*, vol. 40, no. 2, pp. 394-398.
- CALLOW, M. y CALLOW, J., 2002. Marine biofouling: a sticky problema. *Biologist*, Vol 49, no. 1, pp. 1-5.
- CAVERO, P. y RODRÍGUEZ, P., 2008. Producción sostenida de moluscos bivalvos en el Perú: acuicultura y repoblamiento. En LOVATELLI, A., FARÍAS, A., y URIARTE, I., (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de

- la FAO, Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*, no. 12. Roma, FAO. pp. 209–218.
- CHARACKLIS, W.G. y BRYERS, J.D. 1990. Biofilms in Wastewater Treatment. In: Biofilms. W. G. Characklis y KC Marshall. (Eds.) John Wiley, 1990.
- COCK, J.M., TESSMAR-RAIBLE, K, BOYEN, C. y VIARD, F. *Introduction to Marine Genomics, Advances in Marine Genomics*. 1era ed. Dordrecht. Springer, 2010 [Citado 15-12-2018] Disponible en <<https://www.springer.com/gp/book/9789048186167>>. ISBN. 978-90-481-8616-7.
- CORDOVA, K. Evidencias del efecto negativo de la disminución del pH sobre el crecimiento y calcificación de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Asesor: Ernesto Fernández. Tesis para optar el grado de maestro en Ciencias del Mar. UPCH, Escuela de Posgrado, Lima, 2016.
- COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL D.E., KORBER, D.R. y LAPPIN-SCOTT, H.M., 1995. Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, vol. 49, pp. 711-714.
- DIREPRO. Anuario estadístico y pesquero del Ministerio de producción. 2015. [En línea] [Fecha de consulta: 02 de diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.produce.gob.pe/documentos/estadisticas/anuarios/anuario-estadistico-pesca-2015.pdf>.
- DONLAN, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 8, no. 9, pp. 881-890.
- ENCOMENDERO, E., MERINO, F., UCHPA, F. y VÁSQUEZ, R. Efecto de los poliquetos epibiontes sobre la concha de abanico, *Argopecten purpuratus*, cultivada en el Dorado, Chimbote-Perú. V Seminario Virtual de Pesca y Acuicultura. Los Ángeles, California. 2006.

- ESPINOZA, M., GODOY, F., WITTEWER, G., URIARTE, I. y ARANDA, C., 2011. Characterization of culturable bacteria in larval cultures of the Chilean scallop. *Ciencias Marinas*, vol. 37, no. 3, pp. 339-348.
- ESPINOZA, P.M. "Flora bacteriana asociada al cultivo larvario de ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)". Asesor: Felix Godoy Rojas. Tesis de grado. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología Marina, Valdivia, Chile, 2010.
- FAO. Perspectivas desarrollo de la agricultura y del rural en las Américas: una mirada hacia América Latina y el Caribe. 2017. [Citado 10 octubre 2018]. Disponible en: <https://www.produce.gob.pe/documentos/estadisticas/anuarios/anuario-estadistico-pesca-2015.pdf>.
- FAO. Visión general del sector acuícola nacional - Perú. 2005. [En línea] [Fecha de consulta: 02 de enero 2019]. Disponible en: [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_peru/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_peru/es).
- FLEMMING, H.C., 2002. Biofouling in water systems—cases, causes and countermeasures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 59, no. 6, pp. 629-640.
- GIOVANONNI, S., 2002. High throughput culturing for microbial discovery In: Marine Biotechnology in the Twenty-First Century, Problems, Promise and Products, National Research Council, National Academy Press, Printed in USA, 2002, p. 65, ISBN 0-309-08342-7.
- GÓMEZ, J., GÓMEZ, M., BAS, L., RAMOS, C., CAFINI, F., MAESTRE, J. y PRIETO, J., 2013. ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos?. *Rev Esp Quimioter*, vol. 26, no. 2, pp. 97-102.
- GOMEZ-GIL, B., THOMPSON, F.L., THOMPSON, C.C., GARCIA-GASCA, A., ROQUE, A. y SWINGS, J., 2004. *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water

- in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 54, no. 1, pp. 261-265.
- GÓMEZ, G., SOTO, R., GARCÍA, G., ROQUE, A., VÁZQUEZ, J., THOMPSON, F. y SWINGS, J., 2004. Identificación molecular de aislados relacionados con *Vibrio harveyi* asociados con organismos acuáticos enfermos. *Microbiology*, vol. 150, pp. 1769-1777.
- GOSLING, E. *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. Reproduction, Settlement and Recruitment*. First edition. Reino Unido: Blackwell, 2003 [Citado 15-08-2018] Disponible en <[https://malacolog.com/files/Gosling\\_2004.pdf](https://malacolog.com/files/Gosling_2004.pdf)>. ISBN. 0-85238-234-0.
- GRIMES, D., JOHNSON, C., DILLON, K., FLOWERS, A., NORIEA, N., BERUTTI, T., 2009. What genomic sequence information has revealed about *Vibrio* ecology in the ocean—a review. *Microbiology Ecology*, vol. 58, pp. 447-460.
- HANDELSMAN, J., 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology*, vol. 68, no. 4, pp. 669-685.
- HEIDELBERG, J.F., HEIDELBERG, K.B. y COLWELL, R.R., 2002. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 11, pp. 5488-5497.
- HELLWEGER, F.L, VAN SEBILLE, E., FREDRICK, N.D., 2014. Biogeographic patterns in ocean microbes emerge in a neutral agent-based model. *Science*, vol. 345, no. 6202, pp. 1346-1349.
- HENTZER, M., RIEDEL, K., RASMUSSEN, T.B., 2002. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*, vol. 148, pp. 87-102.
- HERNÁNDEZ, Z.G., 2000. Estandarización de las metodologías de FISH Y PCR y su utilización en la identificación filogenética de comunidades bacterianas en ostión

(*Crassostrea gigas*). Asesor: Jorge Olmos. Tesis de Maestría en Ciencias. CICESE, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 2000.

HONGYUE, D. y CHARLES, L., 2000. Bacterial Primary Colonization and Early Succession on Surfaces in Marine Waters as Determined by Amplified rRNA Gene Restriction Analysis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 2, pp. 467-475.

IMARPE. Monitoreo Satelital Diario de Parámetros Oceanográficos del Mar Peruano. Temperatura superficial del mar, 2017. [Citado 02 enero 2018]. Disponible en: [http://satelite.imarpe.gob.pe/uprsig/sst\\_prov.html](http://satelite.imarpe.gob.pe/uprsig/sst_prov.html).

IMARPE. GARCÍA, V., RUBIO, J. Calidad del ambiente marino y costero en la región Áncash, 2012. *Inf Inst Mar Perú*, vol. 42, no. 4, Octubre-Diciembre 2015. Disponible en: <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe/bitstream/123456789/2992/3/Informe%2042%284%29-2.pdf>.

IMARPE. Estudio de línea base en el ámbito marino de bahía de Samanco, 2008. 13-24 diciembre. [Citado 11 octubre 2018]. Disponible en: <http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/informeLB-Samanco.pdf>.

INBAKANDAN, D., SRIYUTHA-MURTHY, P., VENKATESAN, y AJMAL, S. 2010. 16S rDNA sequence analysis of culturable marine biofilm forming bacteria from a ship's hull, Biofouling. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, cap. 26, vol. 8, pp. 893-899.

JOINT, I., MÜHLING, M. y QUERELLOU, J., 2010. Minireview Culturing marine bacteria – an essential prerequisite for biodiscovery. *Microbial Biotechnology*, vol. 3, no. 5, pp. 564–575.

- JULISTIONO, H., HIDAYATI, Y., YUSLAINI, N., NDITASARI, A., DINOTO, A., SUNDJONO, N., L., PRIYOTOMO, G. y GUNAWAN, H. Identification of biofilm-forming bacteria from steel panels exposed in sea waters of Jakarta Bay and Madura Strait. *AIP Conference Proceedings*. Indonesia, Agosto 2008.
- KAEBERLEIN, T., LEWIS, K. y EPSTEIN, S.S., 2002. Isolation Uncultivable microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, vol. 296, pp. 1127-1129.
- KAISER, D., 2000. Bacterial motility: How do pili pull?. *Current Biology*, vol. 10, pp. 777-780.
- KHANDEPARKER, L., D'COSTA, P.M, ANIL, A.C. y SWANT, S.S., 2014. Interactions of bacteria with diatoms: influence on natural marine biofilms. *Mar. Ecol.* Vol. 35, no. 2, pp. 233–248.
- KIRCHMAN, D.L. Uptake and Regeneration of Inorganic Nutrients by Marine Heterotrophic Bacteria (Chapter 9). KIRCHMAN, D.L. (edit). *Microbial Ecology of the Oceans*, New York, 2000, pp. 262-288.
- KIMURA M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, vol. 16, p.111-120.
- KILLEA, M.L. Microbial community composition of marine biofilms in a northern temperate. Advisor: Lucie Maranda. Master of thesis. University of Rhode Island, Department of Science and Oceanography, USA, 2014.
- KJELLEBERG, S., RAO, D. y WEEBB, J.S., 2005. Competitive Interactions in Mixed-Species Biofilms Containing the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied And Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 4, pp. 1729–1736.
- KOGURE, K. y IKEMOTO, E., 1998. Attachment of *Vibrio alginolyticus* to Glass Surfaces Is Dependent on Swimming Speed. *Journal of Bacteriology*, vol. 180, no. 4, pp. 932-937.
- KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P. y WOODS, G. Diagnostico

- Microbiológico, Texto y atlas en color. Ed Med Panamericana: España, 2006.
- LADAU, J., SHARPTON, T., FINUCANE, M., JOSPIN, G., KEMBEL, W., O'DWYER, J., & KOEPPPEL, A., GREEN, L. y POLLARD, K., 2013. Global marine bacterial diversity peaks at high latitudes in winter. *The ISME journal*, vol. 7, no. 9, pp. 1669-1677.
- LEÓN, J., LIBIA, L., SOTO, I., TORRES, M., OROSCO, A., 2010. Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*, vol. 27, no. 2, pp. 215-221.
- LEÓN, J., GARCÍA-TELLO, P., 1998. Cepas nativas del bacterioneuston marino y su actividad inhibitoria de bacterias ictiopatógenas. *Rev. Perú Biol*, vol. 5, no. 1, pp. 47-64.
- LI, J. y CRAIG, J., 2008. Type IV Pili: Paradoxes In Form And Function. *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 18, no. 2, pp. 267-277.
- LOAYZA, R., TRESIERRA, Á., 2014. Variación del “biofouling” en linternas de cultivo de “concha de abanico” *Argopecten purpuratus* en bahía Samanco, Ancash, Perú. *Rev Ciencia y Tecnología*, vol. 10, no. 2, pp. 19-34.
- LOAYZA, R., 2011. Problemática del biofouling en el cultivo de *Argopecten purpuratus* en el Perú. *Rev AquaTIC*, vol. 35, no. 11, pp. 9-19.
- LUGIOYO, M. Distribución, relaciones tróficas y diversidad del bacterioplancton de las aguas oceánicas de Cuba. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, Ministerio de ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Cuba, 2003, pp. 140.
- MAEDA-MARTINEZ A. 2002. *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Primera ed. México. Limusa, S.A., 2002, pp. 501.
- MANCILLA, M.A. “Aislamiento, caracterización y actividad microbiana de la microbiota bacteriana de agua y sedimentos marinos de la costa de Valdivia”. Asesor: Sergio Leyva. Tesis Título profesional. Universidad Austral de Chile, Escuela de ciencias,

Valdivia, 2003.

MAPCARTA. Ubicación playa Guaynuma [en línea]. [Citado 09 setiembre 2018].  
Disponible en: <https://mapcarta.com/es/25465156>.

MARQUINA, D. y SANTOS, A. 2010, Procesos biológicos regulados por el quorum sensing. *Reduca (biología)*, vol. 3, no. 5, pp: 56-74.

MARTÍNEZ, Y.R. "Evaluación de un bioensayo para medir la inhibición de biopelículas bacterianas como indicativo de la actividad *antifouling* de compuestos de origen natural." Asesora: Catalina Arévalo Ferro. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias, Microbiología, Colombia, 2010.

MATHEUS, V.D. y CAMPOS M.C. "Diagnóstico de la inocuidad y propuesta de buenas prácticas Acuícolas para el cultivo de concha de abanicos (*Argopecten purpuratus*) en ACQUAPISCO S.A.". Lima – Perú. 2016. Tesis no publicada.

MATSUMURA, K., NAGANO, M., FUSETANI, N., 1998. Purification of a larval settlement-inducing protein complex (SIPC) of the barnacle, *Balanus Amphitrite*. *Comparative Physiology and Biochemistry*, vol. 281, pp. 12-20.

MENDO, J. y WOLFF, M., 2003. El impacto de El Niño sobre la producción de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en Bahía Independencia, Pisco, Perú. *Ecología aplicada*, vol. 2, no. 1, pp. 51-57.

MICROBIOLOGÍA33. Tinción Gram, Catalasa y Oxidasa [en línea]. [Citado 09 setiembre 2018]. Disponible en: <https://microbiologia33blog.wordpress.com/2016/06/17/tincion-de-gram-catalasa-y-oxidasa/>.

MINSETUR. Lima: FERREIROS, E., 2010 [en línea]. [Citado 05 noviembre 2018]. Disponible en: [http://transparencia.mincetur.gob.pe/documentos/newweb/portals/0/transparencia/RM\\_Nro\\_195-2010-MINCETUR.pdf](http://transparencia.mincetur.gob.pe/documentos/newweb/portals/0/transparencia/RM_Nro_195-2010-MINCETUR.pdf).

MIRAVET, M.E. Abundancia, actividad y diversidad de las bacterias heterótrofas en el Golfo



- de Batabanó y su uso como indicadores ambientales. Tesis de Doctorado. Universidad de la Habana, Departamento de Biología marina, Cuba, 2003.
- MORADO, G.I., 2017. "Desarrollo de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*". *Revista de la Divulgación Científica*, vol. 3, no. 2, pp. 2283-2288.
- MUÑOZ, D., GRAÜ DE MARÍN, C., MARTÍNEZ, C., 2012. Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas a zonas productoras de moluscos bivalvos, estado sucre, Venezuela. *Revista Científica*, vol. 12, no. 5, pp. 459-467.
- NANDHINI, S., REVATHI, K., 2016. Study on biofouling organisms present on the surface of boats in Royapuram, Chennai. *Nature Environment and Pollution Technology*, vol. 15, no.1, pp. 257-261.
- ShunO, J. Fisiología energética de pectínidos Iberoamericanos. In: Maeda-Martínez (ed.), Los moluscos pectínidos de Iberoamérica. *Rev. Ciencia y Acuicultura*. Mexico. Limusa, 2001. Cap. 3, pp. 61-76.
- NAZCAR, J.C., 2007. Bacterial biofilms. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de cabeza y cuello*, vol. 67, pp. 61-72.
- O'TOOLE, G.A., 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*, vol. 47, no. 47.
- O'TOOLE, G.A., KAPLAN, H. y KOLTER, R., 2000. Biofilm formation as microbial Development. *Rev. Microbiology*, vol. 54, p. 49-79.
- O'TOOLE, G.A. y KOLTER, R., 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, vol. 28, no. 3, pp. 449-461.
- OLMOS, S.J., 2003. Caracterización molecular de bacterias patógenas y organismos marinos cultivados. *Biotecnología Marina*, Mexico, pp. 1-7.  
<https://smbb.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/CONFERENCIASPL>

- PACHECO, A. y GARATE, A., 2005. Bioincrustantes en estructuras de cultivo de *Argopecten purpuratus* en bahía Samanco, Perú. *Rev. Ecología Aplicada*, vol. 4, no.1-2, pp. 149-157.
- PASSMORE, M. y COSTERTON, J.W., 2003. Biofilm, bacterial signaling, and their ties to marine biology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 30, no. 7, pp. 407-413.
- PLATT, M.R., RICH, M.D., y MCLAUGHLIN, J.C., 1995. The role of chitin in the thermoprotection of *Vibrio cholerae*. *Journal of Food Protection*, vol. 58, no. 5, pp. 513-514.
- PRIEUR, D., NICOLAS, J.A., PLUSQUELLEC, A., y VIGNUELLE, M., 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanography Marine Biology Annual Review*, vol. 28, pp. 277-352.
- PRODUCE. Desenvolvimiento productivo de la actividad pesquera. Boletín pesquero. 2019. [En línea] [Fecha de consulta: 16 de octubre 2019]. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/375650/Bol-Pesca-FEB-19-1-20.pdf>.
- PRODUCE. Desenvolvimiento productivo de la actividad pesquera. Boletín pesquero. 2017. [En línea] [Fecha de consulta: 17 de octubre 2019]. Disponible en: [http://demi.produce.gob.pe/images/publicaciones/publi652e59845bb4d3682\\_71.pdf](http://demi.produce.gob.pe/images/publicaciones/publi652e59845bb4d3682_71.pdf).
- PRODUCE. Manual de Cultivo Suspendido de la concha de Abanico. Dirección General de Capacitación y Desarrollo Técnico en Acuicultura, Lima. 2016. [En línea] [Fecha de consulta: 12 de diciembre 2018]. Disponible en: [http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/manual\\_suspendido\\_abanico.pdf](http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/manual_suspendido_abanico.pdf).
- PRODUCE. 2010. Plan Nacional de desarrollo acuícola (2010 – 2021), Lima. 2010. [En

línea] [Fecha de consulta: 03 de diciembre 2018]. Disponible en:  
<https://www.produce.gob.pe/documentos/acuicultura/pnda-resumen-sp.pdf>.

PRODUCE. Anuario estadístico pesquero y acuícola. Dirección de Estudios y Derechos Económicos Pesquero y Acuícolas. 2006 [En línea] [Fecha de consulta: 13 agosto 2018]. Disponible en: <http://www.produce.gob.pe/images/produce/estadisticas/boletines/2016/12/pesca.pdf>.

PRODUCE. Manual de cultivo suspendido de concha de abanico. Acuerdo de colaboracion interinstitucional, AECL, PADESPA y FONDEPES. Junio 2004. [En línea] [Fecha de consulta: 13 de diciembre 2018]. Disponible en: [http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/manual\\_gamitana.pdf](http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/manual_gamitana.pdf).

PUJALTE, M.J., ORTIGOSA, M., MACIÁN, M.C. y GARAY, E., 1999. Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *International Microbiology*, vol. 2, pp. 259-266.

REYES, L.T. "Biodiversidad bacteriana marina: nuevos taxones cultivables". Asesor: David Ruiz. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, Departamento de Microbiología y Ecología, España, 2012.

RHEINHEIMER, G. *Microbiología de las aguas*. 1era ed. Zaragoza: Acribia, Zaragoza, 1987. 299 p. ISBN. 978-84-200-0614-7.

RIQUELME, C., HAYASHIDA, G., VERGARA, N., VASQUEZ, A., MORALES, Y. y CHAVEZ, P., 1995. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. *Aquaculture*, vol. 138, pp. 49-60.

RODICIO, R. y MENDOZA, C., 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm*

*Infecc Microbiol Clin*, vol. 22, no. 4, pp. 238-245.

RODHOUSE, P.G. y RODEN, C.M., 1987. Carbon Budget for a coastal inlet in relation to intensive cultivation of suspension-feeding bivalve molluscs. *Marine Ecology Progress Series Mar*, vol. 36, no. 3, pp. 225-236.

ROJAS, R., MIRANDA, C., SANTANDER, J. y ROMERO, J., 2016. First Report of *Vibrio tubiashii* Associated with a Massive Larval Mortality Event in a Commercial Hatchery of Scallop *Argopecten purpuratus* in Chile. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7 art. 1473.

ROMALDE, J.L., DIEGUEZ, A.L., LASA, A. y BALBOA, S., 2014. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Front Microbiol.*, vol. 4, no. 2, pp. 413.

ROWE-MAGNUS, D.A, ZOUINE, M. y MAZEL, D. The adaptive genetic arsenal of pathogenic vibrio species: the role of integrons. *The biology of vibrios*, Washington DC: ASM Press, 2006. 111 p. DOI 10.1128/9781555815714.

SHAPIRO, J., 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual Review of Microbiology*, vol. 52, pp. 81-104.

SHARP, G., MACNAIR, N., CAMPBELL, E., BUTTERS, A., RAMSAY, A. y SEMPLE, R., 2006. Fouling of mussel (*Mytilus edulis*) Collectors by Algal Mats, Dynamics, Impacts and Symptomatic Treatment in P.E.I. Canada. *Rev. Science Asia*, vol. 32, no. 1, pp. 87-97.

SITES. Practicas de Microbiología [en línea]. [Citado 09 setiembrebre 2018]. Disponible en: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicasdemicrobiologia/indice/identificacion-bacteriana/oxidasa>.

SOMER, L. Y KASHI, Y., 2003. Method Based on 16S rRNA Sequence for Simultaneous Detection of the Genus *Listeria* and the Species *Listeria monocytogenes* in Food Products. *Journal of Food Protection*, vol. 66, no. 9, pp. 1658-1665.

SOTOMAYOR, M.A. y BALCÁZAR, J.L., 2003. Inhibición de vibrios patógenos de camarón

- por mezclas de cepas probióticas. *Revista AquaTIC*, vol. 19, pp. 9-15.
- SREY, S., JAHID, I.K. y HA, S., 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, vol. 31, pp. 572-85.
- STACKEBRANDT, E., FREDERIKSEN, W., GARRITY, G.M., GRIMONT, P.A., KAMPFER, P., MAIDEN, M.C., NESME, X., ROSSELLÓ-MORA, R., SWINGS, J., TRÜPER, H.G., VAUTERIN, L., WARD, A.C. y WHITMAN, W.B., 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 52, pp. 1043-1047.
- STAROSCIK, A. M. y SMITH. D. C, 2004. Seasonal patterns in bacterioplankton abundance and production in Narragansett Bay, Rhode Island, USA. *Aquatic Microbial Ecology*, vol. 35, no. 3, pp. 275-282.
- STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., HOLA, V., BONAVENTURA, G., DJUKIC, S., IRKOVIC, I.C. y RUZICKA, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, vol. 71, no. 5, pp. 687-690.
- STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D.G. y COSTERTON, J., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, vol. 56, pp. 187-209.
- SU, Z., XIAO, H., YAN, y HUANG, L., 2008. Effect of fouling organisms on food uptake and nutrient release of scallop (*Chlamys nobilis*, Reeve) cultured in Daya Bay. *Journal of Ocean University of China*, vol. 7, no. 1, pp. 93-96.
- SUNAGAWA, S., COELHO, L.P., CHAFFRON, S., KULTIMA, J.R., LABADIE, K., SALAZAR, G., DJAHANSCHIRI, B., ZELLER, G., MENDE, D.R., ALBERTI, A., CORNEJO-CASTILLO, F.M., COSTEA, P.I., CRUAUD, C., D'OVIDIO. F., ENGELEN, S., FERRERA, I., GASOL, J.M., GUIDI, L., HILDEBRAND, F., KOKOSZKA, F., LEPOIVRE, C., LIMA-MENDEZ, G., POULAIN, J., POULOS, B.T., ROYO- LLONCH, M.,

SARMENTO, H., VIEIRA-SILVA, S., DIMIER, C., PICHERAL, M., SEARSON, S., KANDELS-LEWIS, S., COORDINATORS, T.O., BOWLER, C., DE VARGAS, C., GORSKY, G., GRIMSLEY, N., HINGAMP, P., IUDICONE, D, JAILLON, O., NOT, F., OGATA, H., PESANT, S., SPEICH, S., STEMMANN, L., SULLIVAN, M.B., WEISSENBAACH, J., WINCKER, P., KARSENTI, E., RAES, J., ACINAS, S.G. y BORK, P., 2015. Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*, vol. 348, no. 6237, pp. 1261359. DOI 10.1126/science.1261359.

SUNAT. Boletín estadístico mensual. Oficina de estadística, Lima. 2016. [En línea] [Fecha de consulta: 08 de diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.produce.gob.pe/images/produce/estadisticas/boletines/2016/12/pescaperu.pdf>.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., Y KUMAR, S. MEGA 6. 2013. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 30, p. 2725-2729.

THOMPSON, C., THOMPSON, F., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., DAWYNDT, P. y SWINGS, J., 2004. Use of recA as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 54, pp. 919-924.

THOMPSON, J.R. y POLZ, M.F., 2006. Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. The biology of vibrios. *ASM Press. Washington DC*, vol. 13, pp. 190-203.

THOMPSON, F.L, GEVERS, D., THOMPSON, C.C, DAWYNDT, P., NASER, S. HOSTE, B., MUNN, C.B, y SWINGS, J., 2005. Phylogeny and Molecular Identification of *Vibrios* on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *Appl Environ Microbiol*, vol. 71. No. 9, pp. 5107-5115.

TUYENDO, T., QUYEN, D., THI, Q. y CUONG, P., 2012. Isolation and identification of

- marine bacteria from marine mud in Vietnam with antimicrobial activity. *Journal of Vietnamese Environment*, vol. 3, no. 2, pp. 71-75.
- UICN. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. 2007. *Guía para el Desarrollo Sostenible de la Acuicultura Mediterránea. Interacciones entre la Acuicultura y el Medio Ambiente*. UICN, Gland, Suiza y Málaga, España. [En línea] [Fecha de consulta: 18 de mayo 2019]. Disponible en: <http://www.apromar.es/noticias/general/UICN-SGPM-FEAP%20Guia-1.pdf>. pp. 114, ISBN. 978-2-8317-0976-5.
- URIBE, E., LODEIROS, C., FÉLIX-PICO, E. y ETCHEPARE, I., 2001. Epibiontes en pectínidos de Iberoamérica. En: Maeda-Martínez, A.N. (edit.), *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. México: Edit. Limusa, 2001, cap. 13, pp. 249-266.
- VALENZUELA, G.F., CASILLAS-HERNÁNDEZ, R., VILLALPANDO, E. y VARGAS-ALBORES, F., 2015. The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities; El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*, vol. 41, pp. 297-313.
- VALDIVIEZO, V. y ALARCON, V., 1985. Comportamiento del ciclo sexual y cambios en la abundancia relativa de la concha de abanico *Argopecten purpuratus* (L), en el área del Callao durante el fenómeno El Niño 1982-1983. Ciencia, tecnología y agresión ambiental: Fenómeno El Niño. *CONCYTEC*, pp. 455-482.
- VEZZULLI, L., PEZZATI, E., STAUDER, M., STAGNARO, L., VENIER, P. y PRUZZO, C., 2015. Aquatic ecology of the oyster pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus*. *Environ Microbiol*, vol. 17, pp. 1065- 1080.
- VILLARROEL, E., BUITRAGO, E. y LODEIROS, C., 2004. Identificación de factores ambientales que afectan al crecimiento y la supervivencia de *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca: Bivalvia) bajo condiciones de cultivo suspendido en el golfo de Cariaco,

Venezuela. *Rev. Científica FCV-LUZ*, vol. 14, no. 1, pp. 28-35.

VON-AMMON, U., WOOD, S.A., LAROCHE O., ZAIKO, A., TAIT, L., LAVERY, S., INGLIS, G. y POCHON, X., 2017. The impact of artificial surfaces on marine bacterial and eukaryotic biofouling assemblages: A high-throughput sequencing analysis. *Marine Environmental Research*, vol. 133, pp. 57-66. DOI 10.1016/j.marenvres.2017.12.003.

WAHL, M., 1989. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology Progress*, vol. 58, pp.175-189.

WALL, D. y KAISER, D. 1999. Tipo IV pili y motilidad celular. *Mol. Microbiol*, vol. 32, no. 1, pp: 1-10.

WATNICK, P.I., LAURIANO, C.M., KLOSE, K.E., CROAL, L. y KOLTER, R., 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology , biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Molecular Microbiology*, vol. 39, no. 2, pp. 223-235.

WATURANGI, D.E, HARIYANTO, J.P., LOIS, W., HUTAGALUNG, R.A y HWANG, J.K., 2017. Inhibition of marine biofouling by aquatic Actinobacteria and coral-associated marine bacteria. *Malaysian Journal of Microbiology*, vol. 13, no. 2, pp. 92-99.

WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A., LANE, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, cap. 173, pp. 697-703.

WOLFF, M. y MENDO, J., 2000. Management of the Peruvian bay scallop (*Argopecten purpuratus*) metapopulation with regard to environmental change. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems*, vol. 10, pp. 117-126.

WOLFF, M., 1988. Spawning and recruitment in the Peruvian scallop *Argopecten purpuratus*. *Mar Ecol Prog Ser*, vol. 42, pp. 213-217.

YUPANQUI E.C. “Efecto de tres diferentes densidades de cultivo en la tasa de asentamiento larval y supervivencia post larval en un hatchery de concha de abanico, *Argopecten*



*purpuratus* (Lamarck, 1819)". Asesora: Carmen Talledo Cornejo. Tesis para optar el Título profesional. Universidad Nacional De San Agustín de Arequipa, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela profesional de Ingeniería pesquera, Perú. 2018.

ZENGLER, K., TOLEDO, G., RAPEE, M., ELKINS, J., MATHUR, E.J., SHORT, J.M. y KELLER, M., 2002. Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, vol. 99, no. 24, pp. 15681-15686.

## XI. ANEXOS

### 11.1 Protocolos de preparación de medios y reactivos

Los medios de cultivo y reactivos fueron preparados de dos formas:

#### 11.1.1 Por componentes

**Caldo SWT (*Sea Water Triptona*)** **100 ml**

***Componentes:***

- |  |        |
|--|--------|
| - Tryptona bacteriológica (NAPELP0042B-0500) | 0.5 gr |
| - Extracto de levadura (111926)              | 0.3 gr |
| - Glicerol líquido (818709)                  | 0.9 ml |
| - Agua destilada                             | 25 ml  |
| - Agua de mar filtrada                       | 75 ml  |

***Preparación:***

Pesar cada componente, mezclarlos con agua destilada y agua de mar previamente filtrada. Distribuir en recipientes adecuado y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

\*Para Agar SWT solo agregar 2.0 gr de agar para el mismo volumen de medio.

**S.S a 0.85% (*Solución salina*)** **100 ml**

***Componentes:***

- |                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| - Cloruro de Sodio (109945) (NaCl) | 0.85 gr |
| - Agua destilada                   | 100 ml  |

***Preparación:***

Pesar el NaCl y agregar agua destilada. Distribuir en recipientes adecuado y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

## Reactivos para evaluación de adherencia

**Solución cristal de violeta 109218 (al 1%)** **100 ml**

### ***Componentes:***

- Cristal de violeta 2.0 gr
- Alcohol 96°
- Agua destilada 100 ml

### ***Preparación:***

Pesar el agar el Cristal violeta. En un recipiente mezclar con el alcohol y el agua destilada, centrifugar el contenido por 24 h, finalmente filtrar el contenido con papel filtro.

**Ácido acético 818755 (al 30%)** **100 ml**

### ***Componentes:***

- Ácido acético 30 ml
- Agua destilada 70 ml

### ***Preparación:***

Medir el ácido acético y el agua destilada, mezclarlos y dejar reposar por unos minutos.

**PBS 1X** **1 L**

### ***Componentes:***

- Cloruro de sodio 109945 (NaCl) 8.06 gr
- Cloruro de potasio DE11117.9025 (KCl) 0.22 gr
- Fosfato sódico dibásico 109892 1.15 gr
- Fosfato de monopotasio 197294 0.20 gr
- Agua destilada 1 L

### ***Preparación:***

Pesar las sales en el orden como se anotó en los componentes y mezclar con 800 mL de agua destilada en un vaso precipitado sobre un agitador magnético hasta diluir las sales. Ajustar el pH a 7.4 con 1M HCl o 10M NaOH (según sea necesario) y añadir gota a gota cada reactivo. Aforar la solución con agua destilada hasta 1 L. Filtrar la solución mediante discos de filtración de 0.45 µm. Finalmente esterilizar en autoclave.

#### **11.1.2 Siguiendo las instrucciones del fabricante**

##### **Caldo LB (Miller) 110285**

\*Para Agar LB solo agregar 2.0 gramos de agar por 100 ml de agua destilada.

##### **Agar TCBS 110263**

##### **Caldo TSB (CASO 105459) al 2%**

\*Para Agar TSB solo agregar 2.0 gramos de agar para el mismo volumen de medio.

##### **Batería bioquímica**

Todos los medios utilizados para la batería bioquímica fueron suplementado al 2% con NaCl.

- Agar TSI 103915 (Agar triple azúcar de Hierro)
- Agar LIA 111640 (Agar Lisina Hierro)
- Caldo MR-VP 105712 (Caldo Rojo Metilo-Voges-Proscauer)
- L-Lisina 105700
- L-Arginina 101542
- L-Ornitina 106906
- Medio basal Oxidación-Fermentación 110282 (*Hugh Leifson*)
- Medio SIM 105470 (Sulfuro Indol Movilidad)
- Agar Citrato de Simmons 102501

**11.2 Características culturales de bacterias fuertemente productoras de *biofilm* aisladas del cultivo de “concha de abanico” (*A. purpuratus*), en la bahía de Huaynuma – Casma, Perú.**

**CEPA M1 EN AGAR SWT**

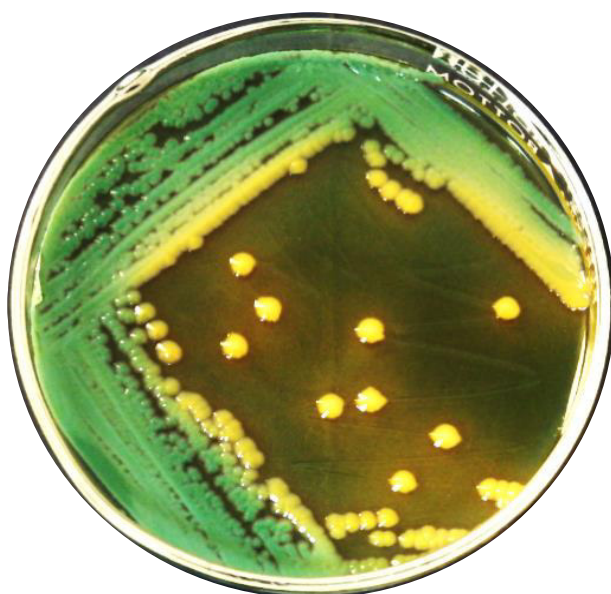


Colonias en cultivo de 24 - 48h

**CARACTERÍSTICAS**

MORFOLOGÍA		M1
Tamaño		6 mm
Forma		Circular
Borde		Ondulada
Superficie		Lisa
Elevación		Plana
Luz transmitida		Opaca
Consistencia		Blanda
Color		Crema
Formación de Halo		+

**CEPA M1 EN AGAR TCBS**



Colonias en cultivo de 24 - 48h

**CARACTERÍSTICAS**

MORFOLOGÍA		M1
Tamaño		6 mm
Forma		Circular
Borde		Ondulada
Superficie		Lisa
Elevación		Convexa
Luz transmitida		Opaca
Consistencia		Mucoide
Color		Amarillo
Formación de Halo		-

---

**CEPA M8 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

---

MORFOLOGÍA	M8
------------	----

---

Tamaño	3 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Plana
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Crema
Formación de Halo	-

---

**CEPA M8 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

---

MORFOLOGÍA	M8
------------	----

---

Tamaño	3 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Amarillo
Formación de Halo	-

---

---

**CEPA M15 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

---

MORFOLOGÍA	M15
Tamaño	3 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Plana
Luz transmitida	Traslúcida
Consistencia	Blanda
Color	Crema
Formación de Halo	-

---

---

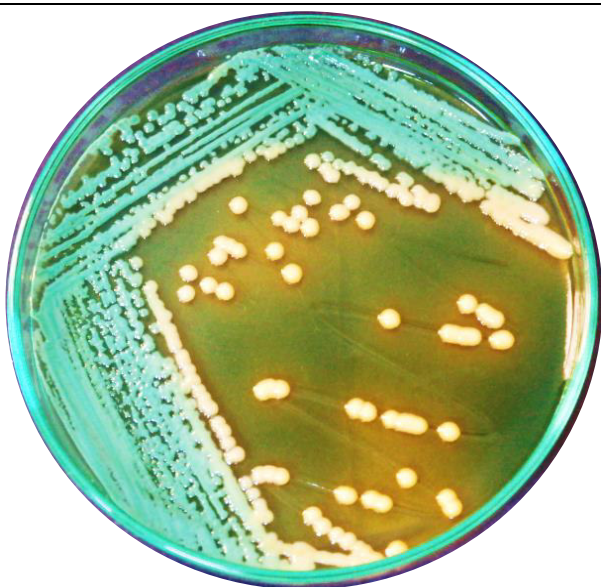
**CEPA M15 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

---

MORFOLOGÍA	M15
Tamaño	4 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Mucoide
Color	Amarillo
Formación de Halo	-

---



---

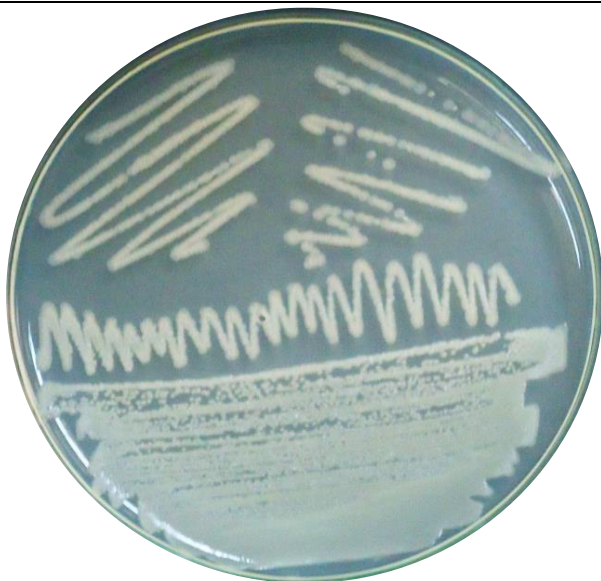
**CEPA M17 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	M17
Tamaño	2 mm
Forma	Circular
Borde	Aserrada
Superficie	Rugosa
Elevación	Umbonada
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Crema
Formación de Halo	-

---

---

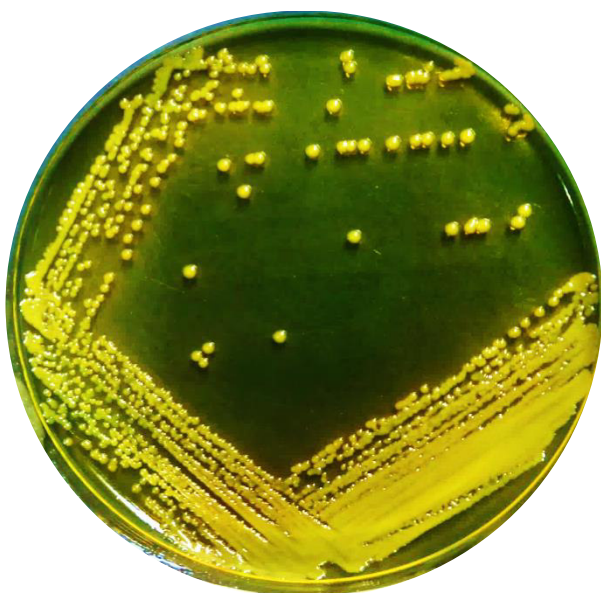
**CEPA M17 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	M17
Tamaño	4 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Amarillo
Formación de Halo	-

---



---

**CEPA M24 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	M24
Tamaño	9mm
Forma	Irregular
Borde	Ondulada
Superficie	Rugosa
Elevación	Plana
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Blanca
Formación de Halo	+

---

---

**CEPA M24 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	M24
Tamaño	4 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Amarillo
Formación de Halo	-

---

---

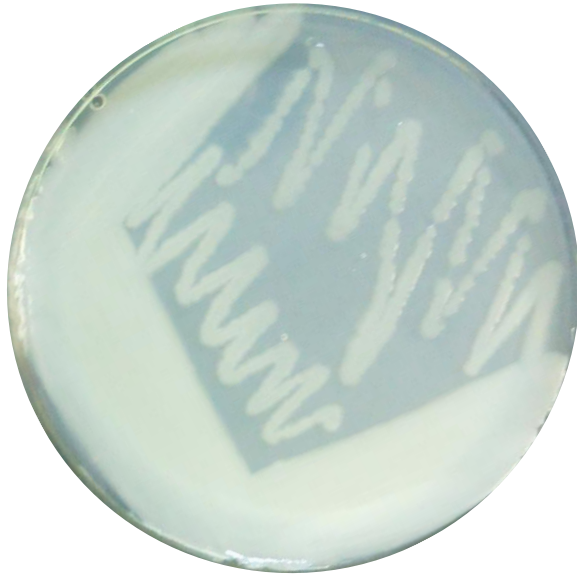
**CEPA M25 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	M25
Tamaño	3mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Rugosa
Elevación	Plana
Luz transmitida	Traslúcida
Consistencia	Blanda
Color	Blanca
Formación de Halo	-

---

---

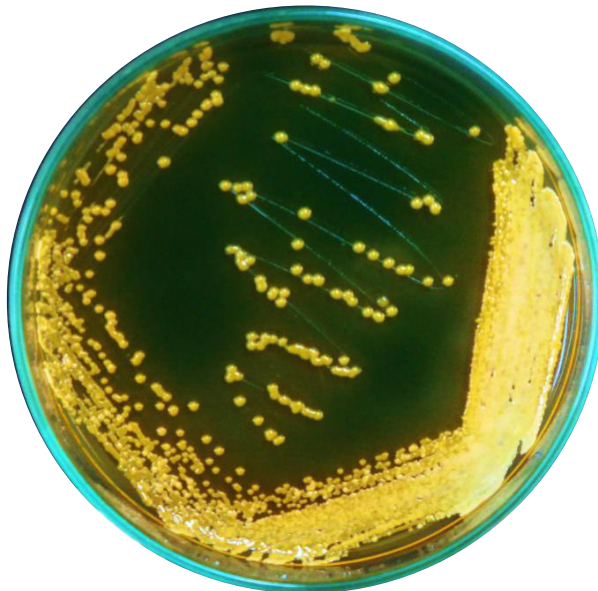
**CEPA M25 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	M25
Tamaño	3 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Mucoide
Color	Amarillo
Formación de Halo	-

---

---

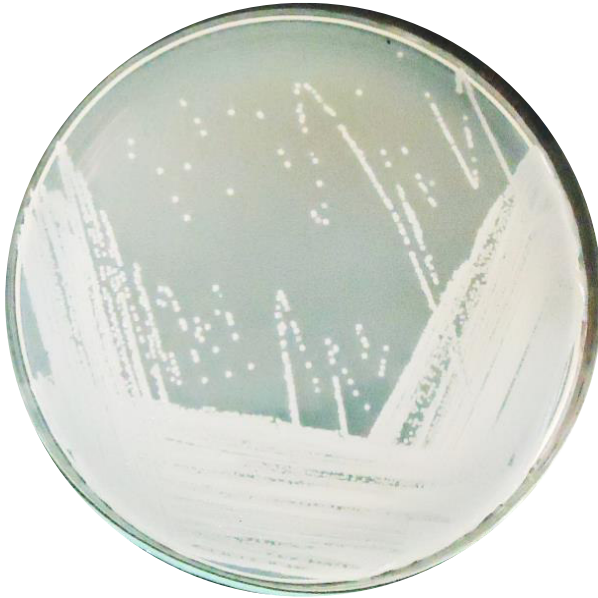
**CEPA M28 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	M28
Tamaño	2 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Blanca
Formación de Halo	-

---

---

**CEPA M28 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	M28
Tamaño	5 mm
Forma	Circular
Borde	Ondulada
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Mucoide
Color	Verde
Formación de Halo	-

---

---

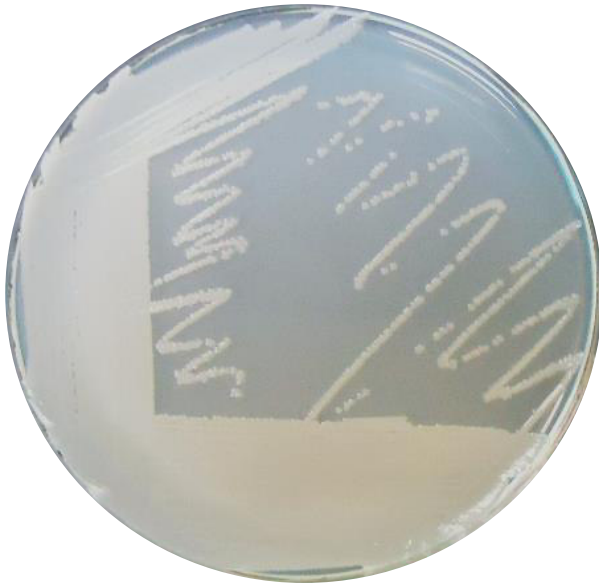
**CEPA M30 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	M30
Tamaño	2 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Crema
Formación de Halo	-

---

---

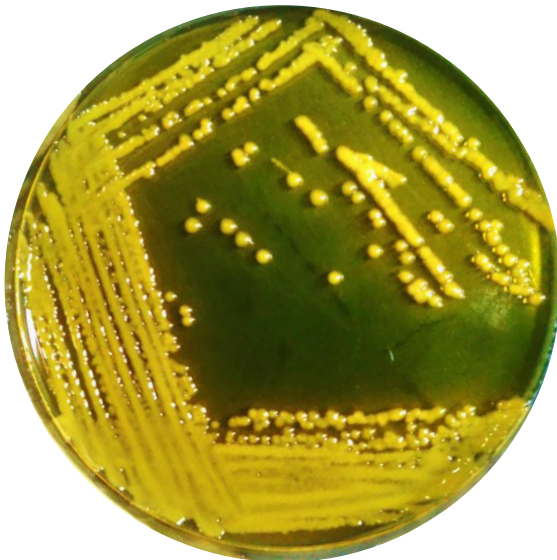
**CEPA M30 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	M30
Tamaño	4 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Amarillo
Formación de Halo	-

---



---

**CEPA M32 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	M32
Tamaño	1cm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Rugosa
Elevación	Plana
Luz transmitida	Transparente
Consistencia	Blanda
Color	Crema
Formación de Halo	-

---

---

**CEPA M32 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	M32
Tamaño	5 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Mucoide
Color	Amarillo
Formación de Halo	-

---

---

**CEPA MX51 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	MX51
Tamaño	4 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Crema
Formación de Halo	-

---

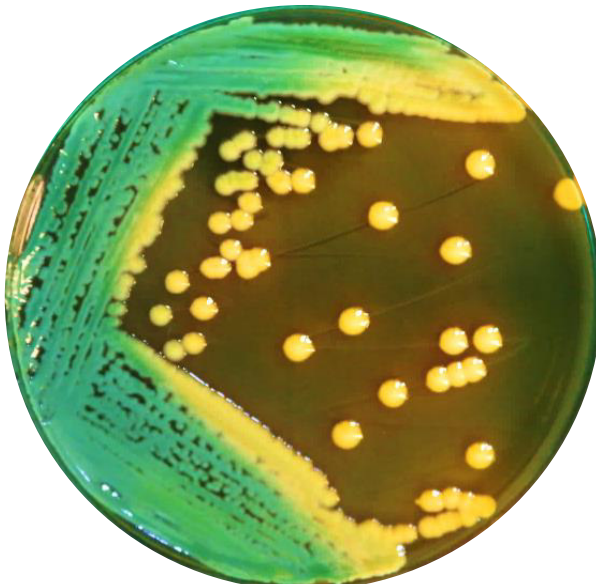
**CEPA MX51 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	MX51
Tamaño	5 mm
Forma	Circular
Borde	Ondulado
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaco
Consistencia	Mucoide
Color	Amarillo
Formación de Halo	-

---

**CEPA MP7 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	MP7
Tamaño	9 mm
Forma	Irregular
Borde	Aserrada
Superficie	Lisa
Elevación	Plana
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Crema
Formación de Halo	+

---

---

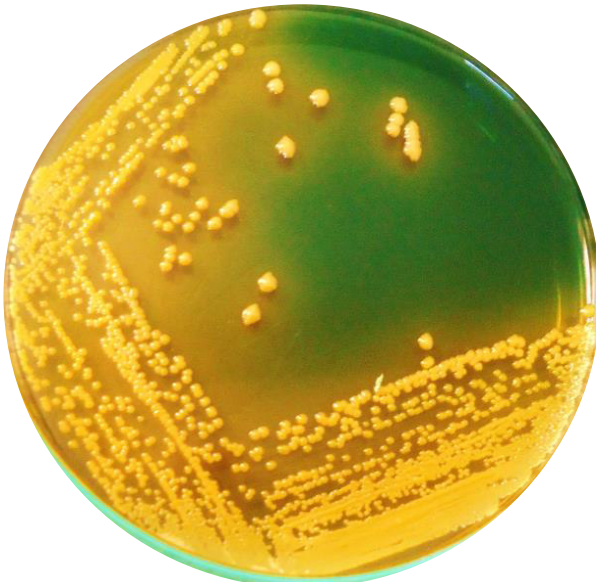
**CEPA MP7 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	MP7
Tamaño	mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Mucoide
Color	Amarillo
Formación de Halo	-

---

---

**CEPA MT7 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	MT7
Tamaño	4 mm
Forma	Ahusada
Borde	Entera
Superficie	Rugosa
Elevación	Plana
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Crema
Formación de Halo	+

---

---

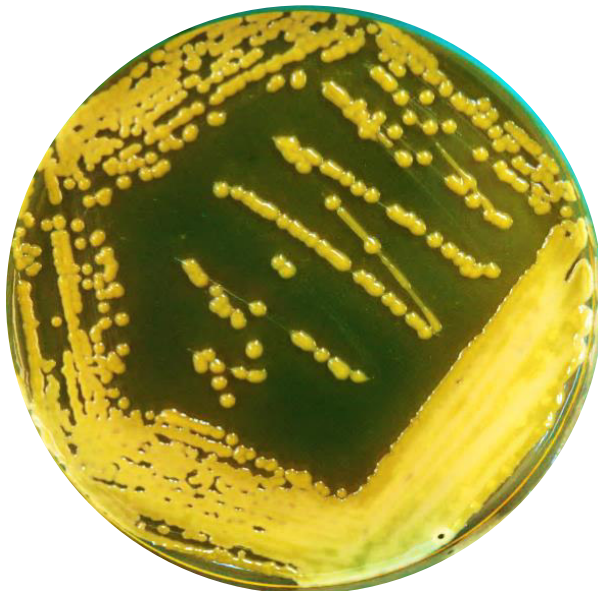
**CEPA MT7 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	MT7
Tamaño	4 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Amarillo
Formación de Halo	-

---



---

**CEPA MT8 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	MT8
Tamaño	No definido
Forma	Irregular
Borde	No definido
Superficie	Lisa
Elevación	Plana
Luz transmitida	Traslúcida
Consistencia	Blanda
Color	Crema
Formación de Halo	-

---

---

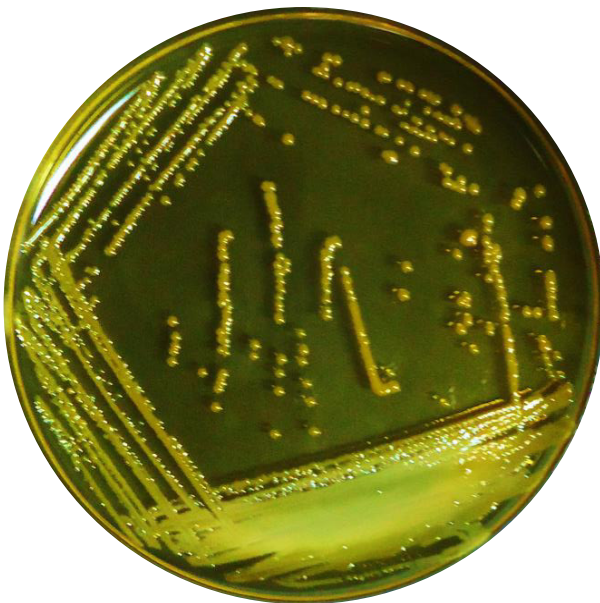
**CEPA MT8 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	MT8
Tamaño	4 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Amarillo
Formación de Halo	-

---

---

**CEPA CG5 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	CG5
Tamaño	3 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Crema
Formación de Halo	-

---

---

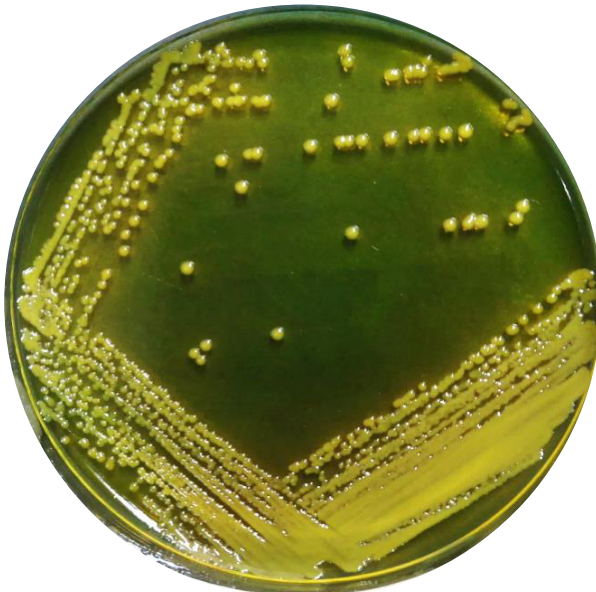
**CEPA CG5 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	CG5
Tamaño	4 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Amarillo
Formación de Halo	-

---

---

**CEPA CS39 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	CS39
Tamaño	8 mm
Forma	Ahusada
Borde	Entera
Superficie	Rugosa
Elevación	Plana
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Crema
Formación de Halo	+

---

---

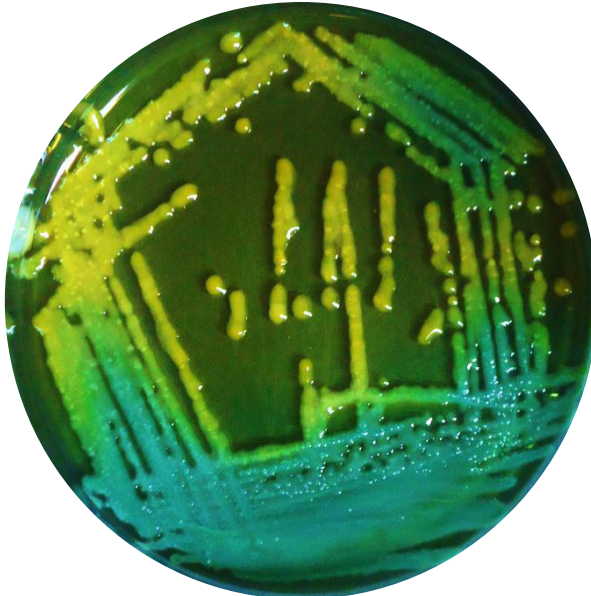
**CEPA CS39 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	CS39
Tamaño	5 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Amarillo
Formación de Halo	-

---

---

**CEPA CS5 EN AGAR SWT**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

MORFOLOGÍA	CS5
Tamaño	4 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Beige
Formación de Halo	-

---

---

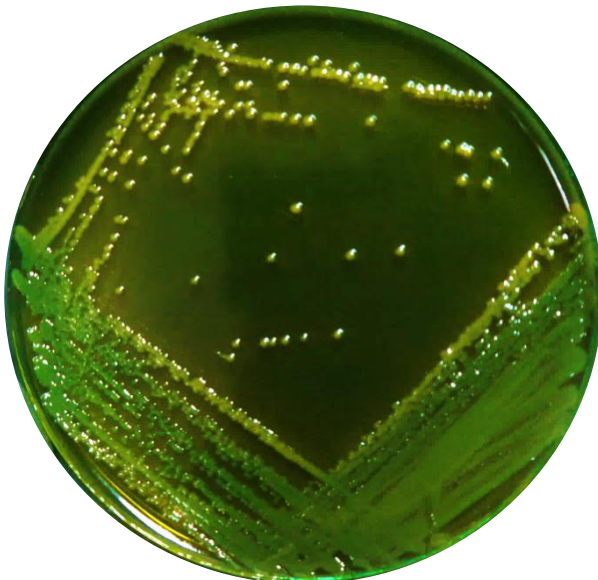
**CEPA CS5 EN AGAR TCBS**

---

---

**CARACTERÍSTICAS**

---



Colonias en cultivo de 24 - 48h

---

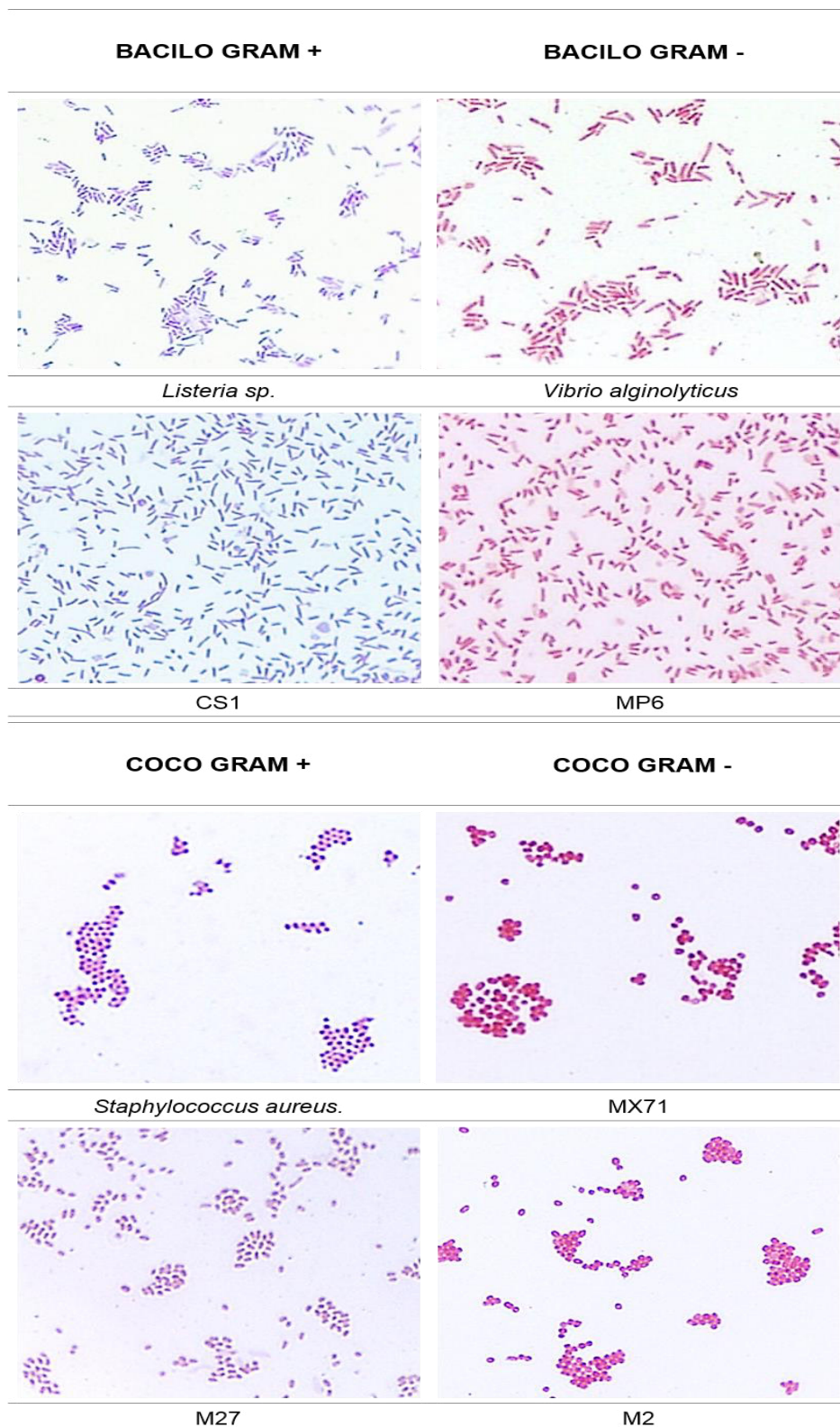
MORFOLOGÍA	CS5
Tamaño	3 mm
Forma	Circular
Borde	Entera
Superficie	Lisa
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Blanda
Color	Amarillo-verdoso
Formación de Halo	-

---



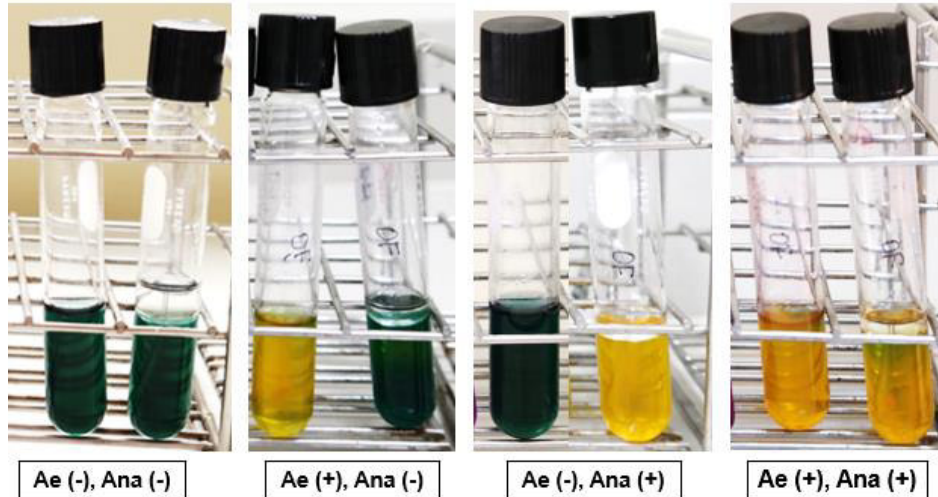
### 11.3 Imágenes de Tinción Gram y pruebas bioquímicas

#### - Tinción Gram



Morfología de cepas bacterianas (Gram+, Gram-, cocos y bacilos) utilizadas como control para la prueba de Tinción Gram.

- **Prueba de Oxidación-Reducción de carbohidratos de cepas en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.**



**Ae (-):** Degradación negativo del azúcar en condiciones de aerobiosis

**Ae (+):** Degradación positivo del azúcar en condiciones de aerobiosis

**Ana (-):** Degradación negativo del azúcar en condiciones de anaerobiosis

**Ana (+):** Degradación positivo del azúcar en condiciones de anaerobiosis

- **Batería de pruebas bioquímicas**



Pruebas bioquímicas de la cepa M8, suplementados al 1% de NaCl